



Catarina Isabel Fernandes Lourenço

Licenciada

**Diagnóstico laboratorial em microbiologia clínica:
Um estudo no centro hospitalar**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches, Professora Doutora,
UNL/ FCT

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Professora Doutora Rita Maria Rodrigues Teixeira de Castro

Vogais: Professora Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro 2012

Diagnóstico laboratorial em microbiologia clínica: Um estudo no centro hospitalar

Copyright Catarina Lourenço, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Concluindo este longo percurso existem agradecimentos que não posso deixar de fazer.

Quero agradecer ao Centro Hospitalar que me disponibilizou este estágio e a toda a equipa do laboratório de análises clínicas, em especial à secção de microbiologia.

Aos meus pais e ao meu mano, que sempre me apoiaram em tudo e que possibilitaram a minha evolução a nível académico.

Ao meu namorado, não só pela maneira como sempre me tratou, mas também por todo o apoio que me deu nos momentos em que me apeteceu desistir de tudo. Por me devolver sempre a vontade de fazer mais e melhor.

Aos amigos que sempre estiveram do meu lado e que me proporcionaram momentos únicos, especiais e inquecíveis, nomeadamente: Cláudia Pinheiro, Tatiana Fera, Débora Fera, Andreia Forte, Marta Monteiro, Rui Semião, Carina Silva, André Monteiro, Nádía Silvestre, Paulo Palminha, Carla Correia, Patricia Barreiros, Cecilia Bento, Sandra Piçarra, Maria Moniz, Arménio Silva, Edgar Gramacho e Bruno Gonçalves.

A todos os colegas de curso, especialmente à Ana Cláudia, Cátia e Nádía, pelas horas de estudo que passamos juntas, e pelos sorrisos que partilhamos tantas vezes.

Aos meus padrinhos, afilhada e respectivas famílias, e a todos os familiares que sempre quiseram o melhor para mim: prima Xana, prima Maria Antónia, primo Manel, Avó Adélia, tia Hortence, tio Ramos, tia Maria, tio Renato, prima Ana, primo Paulo, primo Nuno, primo Guilherme, primo Valter, primo Mauro, tio António, tia Quina, prima Isabel, primo António, primo Valter, prima Inês, prima Mavilde, primo Olímpio, primo Tiago, prima Gina, primo Zé, primo Nuno, prima Silvia, primo Pedro, prima Patrícia, primo Diogo, prima Soraia, primo Vitor, prima Anabela, primo Rodrigo, prima Catarina, primo Manel e prima Maria.

À minha cadela Kira, pela companheira que é.

E por último, mas não em último, ao meu grande AVÔ, que mesmo ausente, estará sempre presente no meu coração.

A todos voces o meu muito obrigado por tudo. Estamos juntos!

Catarina Lourenço

Resumo:

A realização do estágio na secção de microbiologia do Serviço de Patologia Clínica de um Centro Hospitalar, durante um período de seis meses (Outubro de 2011-Março de 2012) consistiu em duas fases.

Numa primeira fase (Trabalho 1), realizada durante os seis meses de estágio (de 1 de outubro a 31 de março), foi possível adquirir conhecimentos gerais de bacteriologia, dando atenção à metodologia utilizada no processamento de diferentes amostras biológicas provenientes dos diferentes serviços.

A urina foi o produto mais analisado com 36% (n=3294) das amostras totais.

A segunda fase (Trabalho 2), realizada durante um período de três meses (de 1 de janeiro a 31 de março), incidiu no estudo microbiológico de urinas.

Foram analisadas 1408 amostras de urina provenientes dos vários serviços, com o objectivo de isolar e identificar possíveis agentes infecciosos. Deste estudo resultaram 500 uroculturas positivas (36%), e um total de 604 microrganismos isolados. Com a avaliação por sexo, das uroculturas positivas, foi possível verificar que a prevalência foi maior no sexo feminino (68%) e em idades superiores a 60 anos (63,2%).

Dos 22 tipos de microrganismos isolados o mais frequente foi *E.coli* (46,5%), seguido de outras *Enterobactereaceas* spp. e cocos Gram positivo, podendo esta ordem alterar significativamente com a situação clínica em estudo (doentes internado/externos e doentes algaliados/não algaliados).

Foi ainda possível detectar que o número de amostras polimicrobianas foi mais incidente em indivíduos algaliados (41%) do que em não algaliados (7%), e que a prevalência de uroculturas positivas em algaliados voltou a ser maior para o sexo feminino (58,6%) e para idades superiores a 60 anos (86,9%)

Abstrat

The realization of the internship in microbiology section of the Department of Clinical Pathology of a hospital center, during a period of six months (from October 2011 to March 2012) was built in two parts.

One of these parts (part number one) was made during six months of internship (from October 1 to March 31) it was possible to obtain general knowledge of bacteriology, paying attention to the methodology used in the processing of different biological samples who came from several services. The urine was the most analyzed product at 36% (n = 3294) of the total samples..

The second part (part number two) completed during a period of three months (from January 1 to March 31) focused on the study microbiological of urine. 1408 urine samples from different services were analyzed with the goal of isolate and correctly identify possible infectious agents. From this study resulted 500 urocultures (36%) and a total of 604 isolated microorganisms. With the gender evaluation of the positive urocultures was possible to verify that the prevalence was bigger to the feminine gender (68%) and to people over than 60 years old (63.2%).

From the 22 types of isolated microorganisms the most frequent was E.coli (46,5%) followed by others Enterobactereaceas spp. And Gram positive cocci, this order may change significantly with the clinical condition under study (intern/extern patients and patients with/without catheter).

It was possible to find out that the number of polymicrobial samples was most incident in the individuals with catheter (41%) than in the individuals without catheter (7%). It was still possible to observe that the predominance of positives urocultures was in female individuals with catheter (58,6%) as it was in individuals with ages over 61 years old (86,9%).

Índice Geral

1	Introdução.....	1
1.1	Objectivo do Estágio.....	1
1.2	Flora comensal.....	1
1.3	Tipos de amostras.....	2
1.3.1	Urina.....	2
1.3.2	Sangue.....	3
1.3.3	Amostras provenientes do aparelho reprodutor.....	4
1.3.4	Fezes.....	4
1.3.5	Amostras provenientes das Vias Respiratórias.....	5
1.3.6	Exsudado Cutâneo, de ferida, escara ou auricular externo.....	5
1.3.7	Exsudado Ocular.....	5
1.3.8	Líquidos Corporais.....	6
1.4	Meios de cultura.....	6
1.5	Crescimento bacteriano.....	7
1.6	Preparações a fresco e colorações.....	8
1.6.1	Coloração de Gram.....	9
1.6.2	Coloração álcool-ácido resistente (Ziehl-Neelsen).....	10
1.7	Testes de Identificação.....	10
1.7.1	Oxidase.....	10
1.7.2	Catalase.....	11
1.7.3	Coagulase.....	11
1.7.4	Urease.....	11
1.7.5	Indol.....	12
1.7.6	Teste de CAMP.....	12
1.7.7	Hidrólise de esculina.....	12
1.7.8	Sistemas automatizados.....	133
1.8	Antibiograma - Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA).....	133
1.9	Microrganismos.....	16
1.9.1	Microrganismos Gram negativo:.....	177
1.9.1.1	Família de <i>Enterobacteriaceae</i> :.....	17
1.9.1.2	Bacilos Gram negativo não fermentadores.....	17
1.9.2	Microrganismos Gram positivo:.....	18
1.9.2.1	Família de <i>Staphylococcaceae</i>	18
1.9.2.2	Família de <i>Enterococcaceae</i>	19
1.9.2.3	Família de <i>Streptococcaceae</i>	19
1.9.2.4	Bacilos Gram positivo.....	19

1.9.3	Outros microrganismos	20
2.	Parte Experimental:.....	21
2.1	Materiais, Equipamentos e Reagentes:	21
2.2	Procedimento Experimental	22
2.2.1	Trabalho 1: Estudo estatístico das várias amostras biológicas.....	22
2.2.1.1	Processamento de várias amostras biológicas	22
2.2.1.2	Procedimento efectuado para colorações	26
2.2.2	Trabalho 2: Uroculturas.....	26
3.	Resultados e Discussão	33
3.1	Trabalho 1: Estudo estatístico das várias amostras biológicas	33
3.2	Trabalho 2: Uroculturas	35
4.	Conclusões:	45
5.	Bibliografia	47
6.	Apêndices:	51

Índice de Figuras

Figura 1. 1	Observação microscópica de bacilos Gram negativo	9
Figura 1. 2	Observação microscópica de cocos Gram positivo	9
Figura 1. 3	Morfologia das bactérias	10
Figura 2. 1	Fluxograma com procedimento efectuado em urinas	26
Figura 2. 2	Fluxograma de Bacilos Gram negativo	30
Figura 2. 3	Fluxograma de Cocos Gram positivo	31
Figura 2. 4	Fluxograma de Bacilos Gram positivo.....	31
Figura 6. 1	<i>E.coli</i> em MacConkey	52
Figura 6. 2	<i>E.coli</i> em gelose Sangue	52
Figura 6. 3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> em MacConkey	53
Figura 6. 4	<i>Proteus mirabilis</i> em gelose Sangue	53
Figura 6. 5	<i>Proteus mirabilis</i> em MacConkey.....	53
Figura 6. 6	<i>P.aeruginosa</i> em gelose Sangue	54
Figura 6. 7	<i>P.aeruginosa</i> em MacConkey.....	54
Figura 6. 8	<i>S.aureus</i> em gelose Sangue.....	54
Figura 6. 9	Estafilococos coagulase negativa em gelose Sangue	54
Figura 6. 10	<i>Enterococcus</i> spp. em gelose Sangue	55
Figura 6. 11	<i>S.agalactiae</i> em gelose Sangue	55
Figura 6. 12	<i>S.pneumoniae</i> em gelose Sangue	55
Figura 6. 13	<i>Corynebacterium</i> spp. em gelose Sangue.....	556
Figura 6. 14	Leveduras ao microscópico	556
Figura 6. 15	Demonstração da exigência dos factores de crescimento para <i>H.influenzae</i>	57
Figura 6. 16	<i>H.influenzae</i> em gelose Chocolate.....	57
Figura 6. 17	Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i>	57
Figura 6. 18	Ovo de <i>Trichuris trichiura</i>	57
Figura 6. 19	Quisto de <i>Entamoeba</i> spp.	58
Figura 6. 20	Larva de <i>Strongyloides</i> spp.....	58
Figura 6. 21	Ovo de <i>Ancylostoma</i> spp.	58

Índice de Tabelas

Tabela 1. 1 – Distribuição dos principais microrganismos da flora comensal.....	2
Tabela 1. 2 – Meios de cultura	6
Tabela 1. 3 Locais de acção dos antimicrobianos nas bactérias	13
Tabela 1. 4 – <i>Enterobactereaceas</i> spp. associadas a infecções no homem.....	17
Tabela 3. 1 Produtos biológicos analisados durante o período de estágio	33
Tabela 3. 2 Produtos biológicos analisados nos primeiros seis meses do ano de 2011.....	33
Tabela 3. 3 Resultados positivos e negativos	35
Tabela 3. 4 Resultados positivos consoante o sexo.....	35
Tabela 3. 5 Percentagens de uroculturas positivas no sexo masculino, por grupo etário.....	36
Tabela 3. 6 Percentagens de uroculturas positivas no sexo feminino, por grupo etário	36
Tabela 3. 7 Isolamentos de <i>S.agalactiae</i> por sexo e grupo etário	40
Tabela 3. 8 Amostras polimicrobianas em algaliados e não algaliados.	41
Tabela 3. 9 Percentagens de microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo feminino e grupo etário	43
Tabela 3. 10 Percentagens de microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo masculino e grupo etário	43
Tabela 6. 1 Resistências intrínsecas de Microrganismos Gram negativo	51
Tabela 6. 2 Resistências intrínsecas de Microrganismos Gram positivo.....	51
Tabela 6. 3 Antibióticos utilizados no método de Kirby-Bauer	52
Tabela 6. 4 Resultados de testes de identificação para bacilos Gram negativo.....	58
Tabela 6. 5 Resultados de testes de identificação para Estafilococos.....	59
Tabela 6. 6 Resultados de testes de identificação para Streptococos	59
Tabela 6. 7 Resultados de testes de identificação para Enterococos	59
Tabela 6. 8 Resultados para os microrganismos isolados nas uroculturas positivas	60
Tabela 6. 9 Uroculturas positivas para doentes internos e doentes externos	61
Tabela 6. 10 Uroculturas positivas para doentes algaliados e não algaliados	62

Índice de Gráficos

Gráfico 3. 1	Percentagens de produtos biológicos analisados durante o período de estágio	33
Gráfico 3. 2	Percentagens de produtos biológicos analisados nos primeiros seis meses de 2011	33
Gráfico 3. 3	Percentagens de resultados positivos e negativos.....	35
Gráfico 3. 4	Percentagens de resultados positivos consoante o sexo	35
Gráfico 3. 5	Uroculturas positivas no sexo masculino, por grupo etário.....	36
Gráfico 3. 6	Uroculturas positivas no sexo feminino, por grupo etário	36
Gráfico 3. 7	Distribuição dos microrganismos isolados nas amostras de urina	37
Gráfico 3. 8	Distribuição dos microrganismos isolados por doentes internados e externos.....	39
Gráfico 3. 9	Distribuição dos microrganismos por indivíduos algaliados e não algaliados	41
Gráfico 3. 10	Microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo feminino e grupo etário	43
Gráfico 3. 11	Microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo masculino e grupo etário	43

Lista de abreviaturas

ITU	Infecções do trato urinário
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
CNA	Columbia, colistina e ácido nalidíxico
VCAT	Vancomicina, Colistina, Anfotericina e Trimetoprim
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
Ufc	Unidades formadoras de colónias
Ufc/ml	Unidades formadoras de colónias por mililitro
spp.	Espécies
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Mcf	Mcfarland
TSA	Teste de Susceptibilidade aos antimicrobianos
Lac+	Fermentador de Lactose
Lac-	Não fermentador de Lactose
<i>P.mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>K.oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>A.baumanii</i>	<i>Acinetobacter baumanii</i>
<i>E.faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E.faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>S.epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S.saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P.stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>M.morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P.vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>E.aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>C.koseri</i>	<i>Citrobacter koseri</i>
<i>S.marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>E.cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>S.liquefaciens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
Caldo GN	Caldo para Gram negativos
AM	Antimicrobianos
CMI	Concentração mínima inibitória
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute

1 Introdução

1.1 Objectivo do Estágio

O objectivo do Estágio no laboratório de microbiologia foi o de adquirir conhecimentos gerais sobre microbiologia clínica e tomar contacto com metodologia e técnicas utilizadas no processamento de amostras biológicas provenientes de doentes dos vários serviços hospitalares, como fezes, expectoração e exsudado vaginal, dando especial atenção às amostras de urina

As amostras são inicialmente semeadas em diferentes meios de cultura, e posteriormente incubadas em atmosfera adequada ao crescimento e isolamento de microrganismos. Em algumas amostras são efectuados exames a fresco (ex. urina), e na maioria realizam-se exames pós-coloração.

Depois do crescimento bacteriano procede-se à identificação do agente isolado e à determinação do perfil de susceptibilidade a diversos antimicrobianos (antibiograma). Concluído todo o processo e após validação é introduzido o resultado no sistema informático, para que possa facilmente ser consultado pelo clínico.

1.2 Flora comensal

O nosso organismo é colonizado por milhares de microrganismos. Esta população de microrganismos é numerosa e diversificada e coloniza a pele, mucosas, aparelho respiratório, intestinal, reprodutor e urinário (ver tabela 1.1). A constituição desta flora ocorre no momento do nascimento através da passagem pelo canal do parto e continua posteriormente, até que se estabeleça uma microflora. A microflora do organismo humano, embora de base estável, mantém ao longo da vida de um indivíduo um contínuo fluxo determinado por uma variedade de factores (idade, dieta, alterações hormonais, saúde e higiene pessoal), que contribuem para alterar quantitativa e qualitativamente a microflora. Nas regiões do corpo que são estéreis qualquer isolamento de microrganismo é de extrema importância, e deve ser alvo de estudo (Pinto A.M., 2004).

Várias são as funções desta flora microbiana, podendo destacar-se a sua interferência no metabolismo do hospedeiro, e ainda a defesa contra potenciais microrganismos patogénicos (Pinto A.M., 2004).

Quando os membros da flora comensal são encontrados regularmente numa determinada área corporal são designados como **flora residente**. Quando os microrganismos apenas sobrevivem e não se multiplicam, permanecendo num local por um curto período de tempo, recebem o nome de **flora transitória** (Forbes & Sahm, 2004).

A maioria dos microrganismos encontrados na flora comensal são bactérias. A relação que estes microrganismos estabelecem com o hospedeiro é chamada de **comensalismo**, se for mutuamente benéfica, ou se beneficiarem da relação sem causar danos. Existem também os **patogénicos**

oportunistas, que causam infecções caso haja alterações da flora residente, e os **patogénicos obrigatórios**, cuja presença origina sempre danos no hospedeiro (Forbes & Sahm, 2004).

Tabela 1. 1 – Distribuição dos principais microrganismos da flora comensal (Forbes & Sahm, 2004) (Murray, 2007) (Versalovic, 2011).

Região	Flora comensal	Agentes potencialmente patogénicos
Pele	- <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> - <i>Propionibacterium spp.</i> - <i>Corynebacterium spp.</i>	- <i>S.epidermidis</i> - <i>S.aureus</i>
Olhos (conjuntiva)	- <i>Streptococcus viridans</i> - <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> - <i>Difteróides spp.</i>	- <i>S.pneumoniae</i> - <i>S.aureus</i> - <i>H.influenzae</i> - <i>N.meningitidis</i>
Vias aéreas superiores (Fossas nasais e nasofaringe)	- <i>Streptococcus viridans</i> - <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> - <i>Corynebacterium spp.</i>	- <i>S.pneumoniae</i> - <i>S.aureus</i> - <i>H.influenzae</i>
Aparelho intestinal (intestino grosso e delgado)	- <i>Lactobacillus spp.</i> - <i>Enterococcus spp.</i> - Anaeróbios - <i>Enterobactereaceas spp.</i>	- <i>Salmonella spp.</i> - <i>Campylobacter spp.</i> - <i>E.coli</i> - <i>Shigella spp.</i> - <i>Yersinia spp.</i>
Aparelho urinário (Uretra)	- <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Difteróides spp.</i> - <i>Lactobacillus spp.</i>	- <i>Entecococcus spp.</i> - <i>Enterobactereaceas spp.</i>
Aparelho reprodutor (Vagina)	- <i>Lactobacillus spp.</i> - <i>Streptococcus spp.</i> - <i>Bacteróides spp.</i> - <i>Difteroides spp.</i>	- <i>Trichomonas vaginalis</i> - <i>C.albicans</i> - <i>C.glabrata</i> - <i>N. gonorrhoeae</i>

O conhecimento da flora comensal é muito importante na análise dos produtos biológicos que chegam ao laboratório, para que não sejam obtidos falsos resultados positivos.

1.3 Tipos de amostras

1.3.1 Urina (Urocultura)

O aparelho urinário é formado pelos rins, ureteres, bexiga e uretra, sendo que esta última estrutura possui uma microflora residente. Acima da uretra, todas as áreas do aparelho urinário são estéreis num ser humano saudável, o que faz com que a urina seja habitualmente estéril (Forbes & Sahm, 2004) (Washington Jr. et al, 2006).

Contudo, as bactérias podem invadir a bexiga e causar infecção por duas vias principais: ascendente e descendente. Embora a via ascendente seja mais frequente, ela é favorecida por introdução de corpos estranhos ao organismo (ex: cateter urinário). Ao introduzir um cateter urinário, as bactérias podem ser introduzidas directamente na bexiga ou, mover-se através deste instrumento da uretra até à bexiga, aumentando desta forma o risco de infecção (Forbes & Sahm, 2004).

A disseminação por via descendente pode ser resultado de uma bacteriemia. Qualquer infecção sistémica pode provocar infecção urinária mas certos microrganismos, como *S. aureus* ou espécies de *Salmonella*, são particularmente invasivos. A via descendente é causadora de menos de 5% das ITU (infecções do trato urinário) (Forbes & Sahm, 2004).

As infecções urinárias são uma das infecções mais frequentemente encontradas (Forbes & Sahm, 2004).

Para o estudo das amostras de urina deve ser efectuada uma colheita adequada, tendo em conta a idade e a situação clínica, de forma a minimizar os agentes contaminantes:

- ✓ Jacto médio: colheita para doentes com controlo de esfíncter.
- ✓ Cateter urinário: recolha através de punção do cateter (doentes algaliados).
- ✓ Punção supra-púbica: aspiração de urina directamente da bexiga. Este método assegura uma amostra livre de contaminação (com excepção de microrganismos presentes na pele).
- ✓ Saco colector: recém-nascidos e crianças sem controlo de esfíncter.

Para a validação da amostra é necessário ter em conta alguns critérios, entre eles encontra-se a contagem directa de unidades formadoras de colónias por mililitro (ufc/ml).

Para obtenção do número de ufc/ml deve-se fazer contagem das colónias após incubação da amostra de urina semeada com ansa calibrada e correlacionar com os seguintes dados:

- ✓ Número de ufc/ml $> 10^5$ → Infecção urinária;
- ✓ Número de ufc/ml $< 10^4$ → Contaminação uretral ou vaginal;
- ✓ Número de ufc/ml 10^4 - 10^5 → Avaliação deve ser feita segundo critérios clínicos.

Para as amostras de urina recolhidas pelo método de punção supra-púbica, o método de quantificação anteriormente descrito deve ser ignorado, e devem ser valorizados todos os microrganismos isolados, com excepção de microrganismos comensais da pele (Faria, 2010).

1.3.2 Sangue (Hemocultura)

A invasão microbiana da corrente sanguínea pode ter consequências graves, como choque, insuficiência de múltiplos órgãos, coagulação intravascular disseminada e morte (Forbes & Sahm, 2004).

A presença de um cateter venoso central (CVC) aumenta o risco de colonização por microrganismos podendo levar a disseminação microbiana (Melo et al, 2007).

Perante a suspeita de infecção da corrente sanguínea associada a ponta de cateter deve ser realizado o seu exame microbiológico, bem como de hemocultura com sangue colhido de veia periférica de outro acesso venoso. A amostra de sangue venoso é colhida e inoculada directamente no meio líquido para hemocultura em aerobiose.

As hemoculturas são analisadas num sistema automatizado, como o Bact/Alert, que faz a detecção do crescimento de microrganismos (bactérias e fungos) em amostras de sangue (BioMérieux, Bact/Alert MB, 2004).

Os frascos de hemocultura fornecem um meio de cultura com os nutrientes e condições ambientais recomendadas para os microrganismos normalmente encontrados nas infecções sanguíneas.

Após semeados com sangue, os frascos são colocados no equipamento Bact/Alert onde é feita incubação (35-37°C) e agitação contínua. Bact/Alert utiliza um sensor colorimétrico e luz reflectida para detectar a presença de CO₂. Se existir produção de CO₂, confirma-se a presença de microrganismos que durante a metabolização dos substratos do meio de cultura produzem este gás. Com a produção deste gás dá-se uma alteração da cor do meio existente no frasco de hemocultura e a amostra é lida pelo aparelho como positiva (BioMérieux, Bact/Alert MB, 2004).

O cumprimento rigoroso de medidas de assépsia é extremamente importante na redução da incidência de contaminação (BioMérieux, Bact/Alert MB, 2004).

1.3.3 Amostras provenientes do aparelho reprodutor

Anatomicamente, o aparelho genital feminino é constituído por uma sucessão de cavidades (trompas, útero, endocolo, exocolo e vagina) que se comunicam com o exterior através de uma fenda vulvar (vulva). Esta estrutura permite a entrada de microrganismos patogénicos que podem prejudicar o processo de reprodução (Linhares et al, 2010).

A microflora vaginal constitui um dos mais importantes mecanismos de defesa da função reprodutora, impedindo a proliferação de microrganismos potencialmente patogénicos, nomeadamente devido ao seu ambiente ácido. Este ambiente é mantido por alguns microrganismos presentes, com destaque para *Lactobacillus acidophilus* (bacilo Gram positivo), que é o principal constituinte desta flora (Linhares et al, 2010).

A composição da flora vaginal não é constante, sofrendo variações consoante a idade e estado fisiológico. Na infância e após a menopausa, o pH vaginal é neutro e a flora vaginal é substituída por outras espécies microbianas (Linhares et al, 2010) (Faria, 2010).

No caso de grávidas é necessário fazer a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* para prevenir contaminação materno-fetal (Faria, 2010) (Melo et al, 2007).

Para a detecção de infecções, são efectuadas colheitas de exsudados (ex: exsudado vaginal e do endocolo). As colheitas são efectuadas com zaragatoa e enviadas para o laboratório em meio de transporte adequado.

1.3.4 Fezes (Coproculturas)

O intestino delgado (pH=4.5), encontra-se influenciado pela acidez do estômado (pH=2), apresentando por isso uma flora escassa (Baron, 1996).

Já o intestino grosso (pH=7), contém o um vasto número de microrganismos, sendo que, na grande maioria são bactérias anaeróbias (Vandenplas, 2009).

As infecções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência sobretudo em determinados grupos etários (crianças e idosos).

Para uma avaliação do possível agente infeccioso, deve ser colhida uma amostra de fezes em recipiente adequado.

1.3.5 Amostras provenientes das Vias Respiratórias

O Sistema respiratório pode dividir-se em superior e inferior. A parte superior envolve a epiglote e tecidos circundantes, laringe, cavidade nasal e faringe (Forbes & Sahm, 2004). A parte inferior compreende a traqueia, brônquios, bronquíolos e pulmões.

O diagnóstico de infecções é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras pela flora comensal das vias respiratórias superiores durante a sua colheita (Fonseca et al., 2004). Deve-se ter em conta, os microrganismos presentes nesta flora e observá-los como contaminantes das amostras, e não como causadores de infecção.

Podem ser efectuadas colheitas das seguintes amostras:

- ✓ Expectoração
- ✓ Secrecções brônquicas
- ✓ Lavado brônquico ou Lavado bronco-alveolar
- ✓ Biópsia brônquica ou Biópsia pulmonar
- ✓ Aspirado transtraqueal ou Aspirado pulmonar

O exame microbiológico do exsudado nasal é efectuado para despiste de MRSA (*S.aureus* resistente à meticilina). Cerca de 20 a 30% dos indivíduos saudáveis são portadores de *S.aureus*, podendo existir MRSA. Neste sentido, é importante fazer despiste de MRSA nos doentes hospitalizados, para que seja possível tomar medidas de prevenção e controlo de infecção hospitalar (Versalovic, 2011).

1.3.6 Exsudado Cutâneo, de ferida, escara ou auricular externo:

A pele representa uma barreira consideravelmente eficaz contra as infecções bacterianas. Apesar de viverem sobre a pele muitas bactérias, normalmente são incapazes de provocar uma infecção. Existem mais microrganismos nas zonas mais húmidas da pele (ex: axilas e virilhas).

Quando existe a suspeita de uma infecção, devem ser colhidos exsudados para análise microbiológica, sendo também efectuados exsudados cutâneos para controlo de infecção Hospitalar (Forbes & Sahm, 2004).

1.3.7 Exsudado Ocular:

Devido à sua exposição constante para o meio externo, a conjuntiva está sujeita a contaminação microbiana intensa. A maioria dos microrganismos são removidos por lacrimação (que contém lisozima), ficando apenas uma microbiota relativamente escassa. Quando ocorre uma interrupção do equilíbrio entre a flora residente e transitória, podem surgir doenças (Trindade, 1999) (Baron, 1996).

Perante a suspeita de infecção procede-se à recolha de exsudado ocular.

1.3.8 Líquidos Corporais

Qualquer tecido do organismo ou líquido corporal estéril pode ser invadido e infectado por agentes potencialmente patogénicos (Forbes & Sahm, 2004).

Os líquidos devem ser colhidos seguindo as normas de colheita e devem ser enviados de imediato para o laboratório. Além do já referido sangue, existem outros líquidos estéreis como: líquido peritoneal (cavidade abdominal), líquido pleural (tórax), líquido articular (articulações), LCR (líquido cerebrospinal) e biliar (líquido biliar).

Informação clínica adicional é um dado importante, na pesquisa do agente etiológico e deve ser fornecida ao laboratório, juntamente com a amostra a analisar (Fonseca et al., 2004).

1.4 Meios de cultura:

Os meios de cultura fornecem às bactérias os nutrientes necessários para o seu crescimento (vitaminas, elementos minerais e fontes de energia, essencialmente de carbono e azoto), tornando assim possível a multiplicação de microrganismos em laboratório, sob condições controladas. As exigências metabólicas de bactérias e outros microrganismos são muito diversificadas e alguns microrganismos ainda não são cultiváveis (Forbes & Sahm, 2004) (Nelson & Cox, 2002).

Os meios de cultura podem dividir-se essencialmente em três categorias gerais:

- ✓ Não selectivos: contém nutrientes que favorecem o crescimento da maioria dos microrganismos (Forbes & Sahm, 2004).
- ✓ Selectivos: contém um ou mais agentes que inibem todos os microrganismos excepto os que se pretendem obter (Forbes & Sahm, 2004).
- ✓ Diferenciais: contém factores que permitem às colónias bacterianas exibir certas características que podem ser utilizadas para diferenciação de outras bactérias que crescem no mesmo meio (Forbes & Sahm, 2004).

Apenas alguns meios de cultura são requeridos para uso diário no diagnóstico microbiológico e cabe aos responsáveis do laboratório a escolha dos meios a utilizar.

Tabela 1. 2 – Meios de cultura utilizados neste estudo

Meio	Objectivo principal
MacConkey	Meio de selecção e diferenciação para bacilos entéricos Gram negativo fermentadores e não fermentadores de lactose (nomeadamente <i>Enterobactereaceas</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp.) (Forbes & Sahm, 2004).
Gelose Sangue	Meio não selectivo que permite o crescimento da maioria dos microrganismos (Faria, 2010).
Chocolate	Meio não selectivo particularmente recomendado para o crescimento de estirpes exigentes pertencentes ao género <i>Neisseria</i> e <i>Haemophilus</i> (BioMérieux, 2009).

Columbia-colistina-ácido nalidixico (CNA)	Meio de selecção para microrganismos Gram positivo (BioMérieux, 2009).
Yersinia CIN	Meio de selecção para espécies <i>Yersinia</i> (BioMérieux, 2009).
Campylosel	Meio de selecção para isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. (<i>C.jejuni</i> e <i>C.coli</i> principalmente) (BioMérieux, 2009).
Legionella GVPC	Meio de selecção para maioria das espécies de <i>Legionella</i> (BioMérieux, 2009) (BioMérieux, Gelose Legionella GVPC: Isolamento selectivo das legionellas, 2004).
Sabouraud	Meio de selecção para fungos (BioMérieux, 2009).
D-coccosel (bile-esculina)	Meio de selecção e diferenciação , para diferenciar enterococos de estreptococos (BioMérieux, Produtos conventional culture media, 2012).
Hektoen	Meio de selecção e diferenciação para espécies de <i>Shigella</i> e <i>Salmonella</i> (Becton, Hektoen Enteric Agar, 2011).
Chocolate com Vancomicina, colistina, anfotericina e trimetoprim (V.C.A.T)	Meio de selecção para <i>Neisseria</i> spp. (Forbes & Sahm, 2004).
MRSA	Meio de selecção e diferenciação para <i>S.aureus</i> resistentes a meticilina (MRSA) (BioMérieux, Gelose MRSA, 2006).
Mueller-Hinton	Meio não selectivo usado para o estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos (BioMérieux, Gelose Mueller Hinton 2, 2002).
MacConkey com Sorbitol	Meio de selecção e diferenciação para <i>E.coli</i> O157:H7 (Becton, MacConkey Agar with Sorbitol, 2003).
Granada	Meio de selecção e diferenciação para a detecção de <i>Streptococcus agalactiae</i> (Becton, Granada Medium, 2011).

Além dos meios mencionados anteriormente, existem outros tipos, tais como meios de enriquecimento. São exemplos disso o Caldo para microrganismos Gram negativo (GN), meio selectivo para patogénicos entéricos, o Caldo Todd Hewitt, meio selectivo para Streptococos (ex.: *S.agalactiae*), e a Hemoline que se destina à pesquisa de microrganismos aeróbios (BioMérieux, Caldo Todd Hewitt + Antibióticos, 2003).

1.5 Crescimento bacteriano:

Além dos nutrientes fornecidos pelos meios de cultura, os microrganismos apresentam ainda outras exigências para que o seu crescimento seja obtido com sucesso: temperatura, atmosfera e pH (pH também é fornecido pelo meio de cultura).

A temperatura de incubação que possibilita o crescimento mais rápido num curto período de tempo (geralmente 18-24 horas) é chamada de temperatura óptima. Relativamente às temperaturas podem-se distinguir os seguintes grupos de microrganismos:

- ✓ Bactérias psicrófilas: capazes de crescer a temperaturas baixas (entre 0° e 15°C).
- ✓ Bactérias mesófilas: capazes de crescer entre 20° e 40°C.
- ✓ Bactérias termófilas: capazes de crescer a temperaturas altas (entre 40° e 60°C);

- ✓ Bactérias hipertermófilas: capazes de crescer a temperaturas muito altas (acima de 60°C) (Arcuri & et al, 2008) (Madigan & et al., Biology of Microorganisms, 2012).

A maioria dos microrganismos isolados neste estudo crescem a 36°C ±1, sendo por isso classificados como mesófilos.

A exigência ou não de determinados gases, nomeadamente o Oxigénio e o Dióxido de Carbono, permite classificar as bactérias em:

- ✓ Aeróbios obrigatórios: proliferam no ar ambiente que contem 21% de Oxigénio (O₂) e uma pequena quantidade (0,03%) de Dióxido de Carbono (CO₂);
- ✓ Anaeróbios obrigatórios: não crescem na presença de oxigénio livre, podendo esta atmosfera ser obtida através de geradores, bolsas ou câmaras de anaerobiose, compostas por 5 a 10% de Hidrogénio (H₂) e CO₂, 80 a 90% de Azoto (N₂) e 0% de O₂;
- ✓ Anaeróbios facultativos: crescem na presença ou ausência de oxigénio livre;
- ✓ Captanófilos: requerem maior concentração de CO₂ (5-10%) e aproximadamente 15% de O₂;
- ✓ Microaerófilas: requerem concentrações menores de oxigénio livre (5 a 10%) e maiores de CO₂ (8 a 10%). Este ambiente também pode ser obtido através de geradores ou de bolsas (Forbes & Sahm, 2004).

A maioria dos microrganismos analisados neste estudo são aeróbios e anaeróbios facultativos.

Também o pH interfere no crescimento bacteriano. Este deve ser ajustado, consoante as necessidades da bactéria em estudo. Microrganismos que crescem optimamente a valores de pH aproximadamente neutros, são chamados neutrófilos (a maioria dos analisados neste estudo). Por contraste, os microrganismos que crescem melhor a valores de pH inferiores a 5,5 são chamados acidófilos. Microrganismos que demonstrem um crescimento óptimo a valores de pH superiores a 8, designam-se de alcalifílicos.

A população atinge condições óptimas de crescimento quando se encontram reunidas as condições nutricionais fornecidas pelo meio de cultura, e as condições físicas a que são expostos (temperatura, atmosfera e pH).

1.6 Preparações a fresco e colorações

A observação microscópica é também um procedimento muito importante num laboratório clínico, pois ajuda na validação da amostra.

Existem dois métodos gerais (métodos directos) utilizados na preparação de amostras microbiológicas:

- Exame a Fresco: baseia-se na observação directa da amostra ao microscópio, preservando a forma natural dos microrganismos (Pereira & Petrechen, 2011) (Fonseca et al., 2004).
- Exame pós-coloração: possibilita a coloração e fixação de microrganismos, para posterior observação microscópica (Pereira & Petrechen, 2011).

A maioria das observações microscópicas é feita com coloração. O material celular e os microrganismos são frequentemente transparentes e podem ser mais facilmente distinguidos pelo uso de corantes (Pereira & Petrechen, 2011).

Neste Laboratório são utilizadas dois tipos de colorações: coloração de Gram e coloração de Ziehl-Neelsen.

1.6.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram é um dos métodos de coloração mais importantes utilizados em laboratórios de microbiologia, indispensável para o diagnóstico e identificação de diversos microrganismos. Esta coloração classifica os microrganismos com base nas suas características morfológicas e tinturiais (tamanho, forma e coloração) (Pereira & Palomo, 2010) (Madigan & et al., Biology of Microorganisms, 2012) (Murray, 2007) (Freitas & Picoli, 2007).

Certas bactérias quando tratadas por um corante básico de pararosanilina (ex.: violeta de cristal), e seguidamente pelo iodo, fixam o corante de tal modo que este não é removido pelos diferenciadores como álcool-acetona. A estas bactérias dá-se o nome de bactérias Gram positivo, e coram de azul escuro (Pereira & Palomo, 2010).

A parede das bactérias Gram positivo é basicamente constituída por uma camada espessa de peptidoglicano suficientemente porosa para permitir a passagem de metabolitos para a membrana plasmática (Forbes & Sahm, 2004) (Murray, 2007).

Outras bactérias são descoradas quando é aplicado o diferenciador álcool-acetona, e chamadas de Gram negativo. Estas bactérias apresentam uma fina camada de peptidoglicano na constituição da parede. Para que se possam ver mais facilmente quando observadas ao microscópio, aplica-se um corante de contraste, geralmente vermelho (fucsina ou safranina) (Forbes & Sahm, 2004) (Pereira & Palomo, 2010) (Madigan & et al., Biology of Microorganisms, 2012).

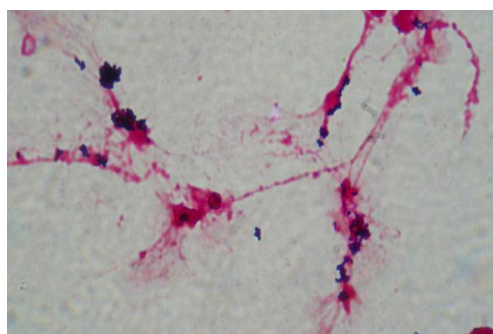


Figura 1. 2 Observação microscópica de cocos Gram positivo em cacho (1000x) (foto deste trabalho).

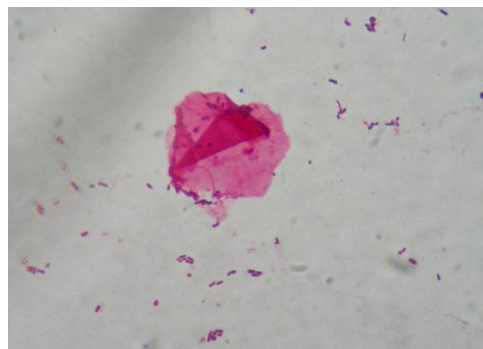


Figura 1. 1 Observação microscópica de bacilos Gram negativo (1000x), onde é também visível uma célula epitelial (foto deste trabalho).

É ainda possível observar, através da coloração de Gram, as diferentes morfologias que as bactérias podem apresentar. Deste modo, as bactérias podem apresentar forma esférica (coco), forma de bastonete (bacilo), forma oval (cocobacilo), forma de vírgula (vibrião), forma ondulada (espirilo), ou

em forma de espiral (espiroqueta) (ver Figura 1) (Madigan & et al., Biology of Microorganisms, 2012) (Murray, 2007).

Algumas bactérias formam ainda agregados podendo dispor-se em: pares, cachos e cadeias.

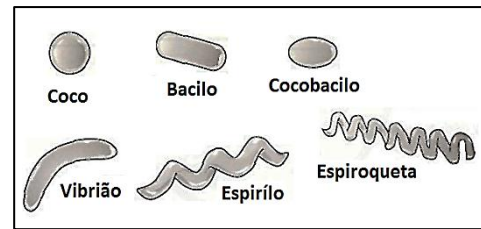


Figura 1. 3 Morfologia das bactérias (Murray, 2007).

1.6.2 Coloração álcool-ácido resistente (Ziehl-Neelsen)

Certos microrganismos possuem na sua parede ácidos gordos de cadeia longa (ácido micólico), que conferem impermeabilidade ao violeta de cristal e a outros corantes básicos. Calor ou detergentes devem ser usados para permitir a entrada de corantes primários nestas bactérias. Uma vez dentro das células bacterianas, o corante não é eliminado mesmo com solvente álcool-ácido.

A coloração Ziehl Neelsen tem como princípio fundamental a coloração álcool-ácido-resistente de microrganismos e diferencia grupos específicos de bactérias como *Mycobacterium* spp. (Pereira & Petrechen, 2011).

1.7 Testes de Identificação

Para a identificação do agente isolado além de se ter em conta as observações macroscópicas (ex: características de colónias nos meios) e microscópicas (ex: características tinturiais e morfológicas), também temos que ter em consideração alguns testes de identificação (Pereira & Petrechen, 2011).

Para identificação do agente etiológico foram realizados os seguintes testes:

1.7.1 Oxidase

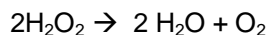
Determina a presença da enzima intracelular Citocromo C Oxidase em bactérias. Esta enzima participa no transporte de electrões das vias metabólicas da maioria das *Pseudomonas* spp., permitindo a diferenciação dos bacilos Gram negativo (Forbes & Sahm, 2004) (Macfaddin, 2000) (BioMérix, 2005) (Versalovic, 2011).

Contudo, deve-se ter em conta algumas limitações deste teste, para que não sejam obtidos resultados falsos:

- Não utilizar ansas de ferro,
- Não utilizar uma cultura mista.

1.7.2 Catalase

Detecta a presença de catalase em bactérias, servindo essencialmente para a distinção de cocos Gram positivo. A catalase é uma enzima intracelular que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) segundo a reacção química:



Quando a catalase está presente verifica-se efervescência na realização da experiência, devido à libertação de oxigénio resultante da hidrólise de H₂O₂ (Forbes & Sahm, 2004) (Macfaddin, 2000) (Versalovic, 2011).

Para evitar resultados falsos, deve-se:

- Evitar a utilização de meios que contêm sangue, pois os eritrócitos podem produzir uma fraca reacção de catalase.

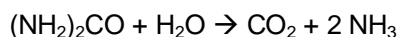
1.7.3 Coagulase

Verifica a capacidade de um microrganismo reagir com o plasma e formar um coágulo, por acção da enzima coagulase. Um teste de coagulase positivo é um critério de diagnóstico presuntivo para identificar *S.aureus*. Desta forma é possível distinguir *Staphylococcus* coagulase positiva de *Staphylococcus* coagulase negativa. As células de uma colónia recente são adicionadas a plasma de coelho. Se o organismo possuir coagulase, a enzima age sobre o fibrogénio no plasma e causa agregação da bactéria (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999) (Macfaddin, 2000) (Versalovic, 2011).

Para que não sejam obtidos resultados de falsos positivos ou falsos negativos deve-se utilizar um número suficiente de colónias na realização do teste (uma a duas colónias).

1.7.4 Urease

Detecta a presença da enzima urease. Esta enzima catalisa a hidrólise de ureia em dióxido de carbono e amónia:



Se a urease estiver presente, hidrolisa a ureia e a amónia resultante aumenta o pH do meio alcalinizando-o, pelo que a sua presença se detecta facilmente por meio de um indicador. A prova é considerada positiva aquando da alteração da cor do meio, e negativa na ausência dessa alteração. Deste modo, este teste ajuda na identificação de certas espécies de *Enterobactereaceas* (ex: *Proteus* spp.) (Forbes & Sahm, 2004) (Versalovic, 2011).

Resultados de falsos positivos são considerados raros, mas podem ocorrer se o teste for lido após 24 horas.

1.7.5 Indol

Determina a capacidade do microrganismo degradar o triptofano até à produção de Indol. O Triptofano é um aminoácido que pode sofrer oxidação pelas actividades enzimáticas de algumas bactérias, devido à presença de triptofanase¹ (Forbes & Sahm, 2004) (Macfaddin, 2000) (Versalovic, 2011).

Para que se obtenha um resultado válido, deve-se considerar como positivo alterações de cor imediatas.

1.7.6 Teste de CAMP

A identificação presuntiva de estreptococos β -hemolíticos do grupo B de Lancefield (*S.agalactiae*) pode ser feita através deste teste. A actividade hemolítica da β -hemolisina produzida pela maioria das estirpes de *S.aureus* é acentuada por uma proteína extracelular produzida por estreptococos do grupo B. Interações da β -hemolisina com esta proteína causam “sinergismo hemolítico”, que é facilmente observado em placa de ágar de sangue, pois a β -hemólise apresenta-se sob a forma de flecha. Este fenómeno é observado quer em isolados hemolíticos, quer não hemolíticos de estreptococos do grupo B (Washington Jr. et al, 2006) (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999).

Para que se obtenham resultados válidos, não devem ser utilizadas colónias velhas de *S.aureus* (pois podem não produzir β -hemolisina), nem se deve tocar as estrias da sementeira (para que não haja resultado de falso positivo).

1.7.7 Hidrólise de esculina

Esta prova utiliza-se para determinar a capacidade de um microrganismo hidrolisar a esculina, presente no meio D-coccosel. A esculina é um composto fluorescente, contudo, aquando da sua hidrólise a fluorescência é perdida e o meio torna-se preto. Deste modo em provas consideradas positivas, o meio sofre alteração de cor para preto, sendo assim possível distinguir os enterococos (positivos para este teste) dos estreptococos.

A incubação do meio deve ser feita em aerobiose, pois existem estreptococos do grupo viridans que conseguem hidrolisar a esculina quando incubados em atmosfera de CO₂ (Forbes & Sahm, 2004) (Washington Jr. et al, 2006).

¹ Termo geral usado para denominar o sistema completo de enzimas que medeiam a produção de Indol

1.7.8 Sistemas automatizados

Pode ainda ser utilizado um sistema automatizado²: Vitek 2 Compact, para a identificação do microrganismo isolado.

Este sistema realiza em simultâneo a identificação de bactérias e os resultados do respectivo teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA) num único relatório e encontra-se associado a um programa de computador que auxilia na interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade (Fonseca et al., 2004) (BioMérieux, VITEK 2 Compact, 2005).

1.8 Antibiógrama - Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O antibiógrama é uma tarefa executada pelo sector de microbiologia clínica, que possibilita avaliar o padrão de resposta de bactérias (padrão de sensibilidade) perante concentrações pré-estabelecidas de antimicrobianos³. Deste modo, as bactérias podem ser consideradas em três categorias: **Resistente (R)**, **Intermédio (I)**, ou **Sensível (S)** ao agente antimicrobiano.

Mecanismos de acção dos antimicrobianos:

O modo como actuam os antimicrobianos baseia-se na inibição de processos essenciais à multiplicação da célula e, em última instância, à sua sobrevivência. São divididos de acordo com a estrutura alvo na célula bacteriana, como evidenciado na tabela 1.3 (Murray, 2007) (Washington Jr. et al, 2006).

tabela 1. 3 Locais de acção dos antimicrobianos nas bactérias (Sousa, 2006).

Local de acção	Exemplos
Síntese da parede celular	Penicilina, Aztreonamo, Imepenemo, Ampicilina, Amoxicilina, Piperacilina, Ticarcilina, Oxacilina, Meticilina, Cefpime, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefalotina, Cefoxitina, Meropenemo, Vancomicina e Teicoplanina
Membrana plasmática	Polimixina B e E (Colistina)
Síntese de ácidos nucleicos	Ácido nalidixíco Ciprofloxacina e Ofloxacina
Síntese proteica	Linezolida, Amicacina, Tobramicina, Gentamicina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Eritromicina, Telitromicina, Lincosamina, Clindamicina, Novobiocina, Estreptomicina, Estreptogramina A (quinupristina), Estreptogramina B (dalfopristina) e Nitrofurantoína.
Anti-metabolitos	Trimetoprim, Sulfonamidas e Cotrimoxazole (Trimetoprim-Sulfametoxazol)

² Neste laboratório, normalmente, procede-se a identificação através de sistemas automatizados, quando se tratam de microrganismos menos frequentes em patologias clínicas, ou quando não é possível a sua identificação através dos testes de identificação mencionados.

³ qualquer tipo de droga, incluindo antibióticos, que tem a capacidade de inibir o crescimento de bactérias ou de as matar, bacteriostática ou bacteriocida, respectivamente.

Mecanismos de Resistência aos antimicrobianos:

Os principais mecanismos de resistência que uma bactéria pode apresentar à acção dos antimicrobianos baseiam-se em:

- a) **Inativação Enzimática:** Inactivação do antibiótico através da produção de enzimas que neutralizam os antibióticos. Estas enzimas podem ser: constitutivas, se forem produzidas independentemente da presença do antimicrobiano; ou induzidas, se o antimicrobiano, quando em contacto com a bactéria, desencadeia ou estimula a produção enzimática que protegerá a bactéria dos efeitos dos antibióticos.
- b) **Alteração da permeabilidade da membrana:** A alteração nos canais de porina impedem a passagem e consequentemente, a acção dos antimicrobianos.
- c) **Efluxo activo de antibióticos:** Capacidade de expulsar activamente os antibióticos para fora da célula através de bombas de efluxo, contribuindo para uma concentração insuficiente à realização do seu efeito.
- d) **Alteração do alvo do antimicrobiano:** Os antimicrobianos ligam-se a alvos específicos na parede celular da bactéria. Se este for alterado o antimicrobiano não se consegue ligar e torna-se ineficaz contra a bactéria.

No contexto da resistência aos antimicrobianos, os organismos procarióticos podem apresentar fundamentalmente os seguintes fenótipos: resistência intrínseca e resistência adquirida.

A resistência intrínseca é uma característica natural apresentada por todos os exemplares de uma determinada bactéria, podendo ser útil na identificação. Exemplo: a resistência de *S.aureus* à polimixina B (ver resistências intrínsecas em apêndice 1).

A resistência adquirida resulta de mutações cromossómicas e/ou transferências de genes de resistência por elementos genéticos móveis através de :

- a) Conjugação, onde o contacto com outras bactérias possibilita a transferência de genes de resistência a antibióticos.
- b) Transformação, onde ocorre a captação de DNA livre no meio ambiente;
- c) Transdução, onde vírus que infectam bactérias (bacteriófagos) transferem genes de virulência para as mesmas (Vieira, 2009) (Stansfield, 2005).

Um outro fenótipo que as bactérias podem apresentar à acção dos antimicrobianos é a susceptibilidade. Esta resulta da ausência total de mecanismos de resistência.

Todas as etapas envolvidas no procedimento do TSA e no resultado do mesmo, são padronizadas por organizações especializadas como:

- ✓ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, EUA) – utilizada neste laboratório
- ✓ British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, Reino Unido);
- ✓ Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, França);
- ✓ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, Europa).

O TSA deve ser realizado para qualquer microrganismo que seja responsável por um processo infeccioso e que necessite de terapêutica antimicrobiana, sempre que a susceptibilidade não puder ser previsível pelo conhecimento da identidade do microrganismo, ou esse microrganismo seja capaz de exibir resistência aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados. Os antimicrobianos a utilizar diferem consoante o tipo de microrganismo em estudo (ver listas em apêndice 2) (CLSI, 2011) (Fonseca et al., 2004).

Os métodos correntes de testes de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA), podem ser classificados em três grandes grupos:

- ✓ Testes de diluição (pontos I e II)
- ✓ Testes de difusão (ponto III)
- ✓ Testes de gradiente de difusão (ponto IV)

I. Macrodiluição em meio líquido

Foi o primeiro método a ser desenvolvido, sendo considerado o de referência. Este método consiste na realização de diluições sucessivas de agente antimicrobiano em caldo, existindo ainda um tubo livre de agente antimicrobiano, para controlo de crescimento. Cada tubo é inoculado com uma suspensão do microrganismo a ser testado e incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 18-24 horas. Após a incubação, os tubos são examinados visualmente pela turvação. A existência desta turvação indica que o crescimento bacteriano não foi inibido pela concentração de agente antimicrobiano presente.

A mais baixa concentração de antimicrobiano em $\mu\text{g/ml}$ que impede o crescimento bacteriano (tubo onde já não é visível turvação) representa a concentração mínima inibitória, CMI.

Contudo, este método não é utilizado devido ao facto de ser muito trabalhoso e dispendioso (Fonseca et al., 2004).

II. Microdiluição em meio líquido (sistemas automatizados)

Na maioria dos laboratórios é utilizado um sistema automatizado que se baseia na adaptação do teste anterior a volumes menores. Este método permite avaliar a susceptibilidade das bactérias contra um vasto painel de AM (antimicrobianos) e a baixo custo. O uso dos sistemas automatizados (ex: Vitek e Walk away) permite a execução dos testes de sensibilidade com maior rapidez, pois estes aparelhos possuem sistemas de detecção óptica capazes de medir alterações discretas do crescimento bacteriano. Neste laboratório é utilizado o sistema automatizado Vitek 2 compact (Fonseca et al., 2004) (BioMérieux, VITEK 2 Compact, 2005).

III. Difusão

Os testes de difusão utilizam uma suspensão bacteriana padronizada que é semeada em meio sólido apropriado ao método utilizado (ex.: gelose Müller-Hinton para o método de Kirby-Baüer). Os discos impregnados em antimicrobianos são colocados na sementeira e após incubação são medidos os tamanhos dos halos de inibição de crescimento, obtendo-se um resultado qualitativo que pode ser lido em Sensível / Intermédio / Resistente (Fonseca et al., 2004).

- Método de KIRBY-BAÜER

O método de difusão em disco utilizado na rotina dos laboratórios clínicos, descrito por Kirby e Baüer em 1966, é um dos métodos de sensibilidade mais simples e confiáveis.

O ágar de Mueller-Hinton é considerado o meio mais adequado para testes de rotina de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas pelas seguintes razões:

- ✓ Permite crescimento satisfatório de microrganismos patogênicos não fastidiosos: A composição deste meio permite o crescimento de bactérias não exigentes (*Enterobacteriaceae spp.*, bacilos Gram negativo não fermentadores, estafilococos e enterococos) detectados em patologia, garantindo um mínimo de interferência dos componentes da fórmula no resultado do antibiograma (BioMérieux, 2009) (BioMérieux, Gelose Mueller Hinton 2, 2002).
- ✓ Contem baixos teores de inibidores de sulfonamida, trimetoprim e tetraciclina: Os meios que contêm teores excessivos de timidina ou timina podem reverter o efeito inibitório destes três antibióticos, produzindo halos de inibição menores e menos nítidos, ou até mesmo nenhum halo de inibição, o que pode resultar em falsa resistência (BioMérieux, 2009) (BioMérieux, Gelose Mueller Hinton 2, 2002) (CLSI, 2011).
- ✓ Concentração ajustada de íons bivalentes: As variações nos cátions divalentes, principalmente magnésio e cálcio, afectam os resultados dos testes de aminoglicosídeos e tetraciclina contra estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*. Um teor excessivo de cátions reduz o tamanho dos halos de inibição, enquanto que um baixo teor de cátions poderá resultar em halos de inibição exageradamente grandes. Por este motivo, a concentração deste meio é ajustada para assegurar uma precisão mais correcta na determinação da sensibilidade das *Pseudomonas spp.* aos aminoglicosídeos e às tetraciclina (BioMérieux, 2009) (CLSI, 2011) (BioMérieux, Gelose Mueller Hinton 2, 2002).

IV. Gradiente de difusão (Etest)

Um dos métodos quantitativos mais utilizados, o Etest, baseia-se em técnicas de diluição e difusão. O sistema compreende um gradiente antimicrobiano pré-definido que é usado para quantificar a CMI em µg/ml (BioMérieux, Products: Etest, 2012).

Quando uma tira de Etest é inoculada numa placa de ágar, há uma imediata difusão do antibiótico pelo meio. Após incubação, além de ser visível um crescimento bacteriano, é também visível uma inibição elíptica à volta da tira (BioMérieux, Products: Etest, 2012).

1.9 Microrganismos

O mundo dos microrganismos é muito vasto, contudo, serão apenas focados aqueles que foram isolados com mais frequência nas amostras clínicas estudadas.

1.9.1 Microrganismos Gram negativo:

Dentro destas características podemos destacar a família das *Enterobacteriaceas* e os bacilos Gram negativo não fermentadores.

1.9.1.1 Família de *Enterobacteriaceas*:

Esta família engloba microrganismos obíquos e constituintes da microbiota intestinal comensal da maioria dos animais, incluindo seres humanos. Estes microrganismos são comuns em infecções humanas, sendo os mais frequentemente isolados num laboratório de microbiologia. Todos os membros desta família são **bacilos Gram negativo, aeróbios e anaeróbios facultativos, oxidase negativo e fermentadores de glicose que crescem em MacConkey** (Fonseca et al., 2004) (Poeta & Rodrigues, 2008-2009) (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999).

Tabela 1. 4 – Lista de espécies *Enterobacteriaceas* que podem ser associadas a infecções no homem (Fonseca et al., 2004).

<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> (grupo A)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Shigella flexneri</i> (grupo B)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Shigella boydii</i> (grupo C)
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Shigella sonnei</i> (grupo D)
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Salmonella</i> (todos os serotipos)
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Proteus penneri</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Providencia retgeri</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Providencia stuarti</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>

Estes microrganismos são associados a infecções gastrointestinais, urinárias e respiratórias, actuando normalmente como patógenos oportunistas (Fonseca et al., 2004).

(ver morfologia típica de algumas *Enterobacteriaceas* em apêndice 3)

1.9.1.2 Bacilo Gram negativo não fermentadores

Existem bactérias que, embora se apresentem como bacilos Gram negativo, tal como a família das *Enterobacteriaceas*, diferem desta por **não utilizarem ou oxidarem a glucose** (ao contrário da família das *Enterobacteriaceas* que a fermentam). São exemplos disso os géneros *Acinetobacter* spp. e *Stenotrophomonas* spp.. Estes microrganismos não fazem parte da flora normal humana, mas devido à alta prevalência de alguns deles em meio hospitalar, essencialmente *Acinetobacter* spp., podem colonizar a pele e o aparelho respiratório de doentes hospitalizados (Fonseca et al., 2004).

Outros microrganismos que se diferenciam da família das *Enterobacteriaceae* por serem **Oxidase positiva**, como é o caso de *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Rhizobium* spp. e *Ochrobactrum* spp..

Pseudomonas aeruginosa é a espécie não pertencente à família das *Enterobacteriaceae* encontrada com mais frequência em amostras clínicas. Também a espécie *Acinetobacter baumannii* é encontrada algumas vezes, enquanto que as restantes raramente se encontram associadas a infecções no ser humano (ver morfologia típica de *P.aeruginosa* em apêndice 4).

1.9.2 Microrganismos Gram positivo:

Destacam-se as famílias: *Micrococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* e *Enterococcaceae*, como sendo as de maior interesse a nível clínico.

1.9.2.1 Família de *Staphylococcaceae*

Os géneros pertencentes a esta família são: *Staphylococcus* spp., *Gemella* spp., *Jeikijelium* spp., *Micrococcus* spp. e *Salinicoccus* spp.. Contudo, os agentes etiológicos mais comuns de doenças humanas são os pertencentes ao género *Staphylococcus* (Forbes & Sahm, 2004) (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999) (Washington Jr. et al, 2006).

Os estafilococos são, geralmente, comensais ou patogénicos oportunistas. A maioria das espécies é **aeróbia ou anaeróbia facultativa, catalase positiva** e apresenta-se frequentemente como cocos em forma de cacho, quando observados ao microscópio após coloração de Gram. Contudo, também podem ser observados isoladamente, aos pares, ou em pequenas cadeias (Forbes & Sahm, 2004) (Washington Jr. et al, 2006) (Poeta & Rodrigues, 2008-2009) (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999).

A espécie patogénica mais encontrada em infecções humanas é o *S.aureus*. A distribuição deste microrganismo é muito ampla podendo ser encontrado em diversos locais, como em alimentos, superfícies secas e em várias regiões do corpo humano (intestino, pele, mucosas, nasofaringe e fossas nasais). *S.aureus* produz uma coagulase, enzima cuja detecção permite distinguir em dois grupos, estafilococos coagulase positiva (*s.aureus*) e estafilococos coagulase negativo. O estafilococo coagulase negativo, mais frequentemente encontrado em amostras clínicas é o *S.epidermidis*, que na maior parte das vezes corresponde a um agente contaminante (Forbes & Sahm, 2004) (Washington Jr. et al, 2006) (Poeta & Rodrigues, 2008-2009) (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999).

Devido à sua virulência, o *Staphylococcus aureus* pode comprometer o organismo humano em infecções sistémicas, ocasionando septicémia, endocardite, choque tóxico e outras complicações, independente da faixa etária e do ambiente em que foi adquirida a infecção (Souza, 2011).

(ver morfologia típica de Estafilococos em apêndice 5)

1.9.2.2 Família de *Enterococcaceae*

Os géneros pertencentes a esta família são: *Enterococcus* spp., *Melissococcus* spp., *Tetragenococcus* spp. e *Vagococcus* spp. Destes microrganismos, os mais encontrados em infecções humanas são os *Enterococcus* spp., nomeadamente: *E.faecalis* e *E.faecium*, que são **aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase negativa** (Forbes & Sahm, 2004) (Washington Jr. et al, 2006) (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999).

Enterococcus spp. é muito associado à infecção hospitalar e a ITU (Fonseca et al., 2004).

(ver morfologia típica de Enterococos em apêndice 6)

1.9.2.3 Família de *Streptococcaceae*

Os microrganismos desta família dispõem-se normalmente aos pares (diplococos) ou em cadeias lineares, quando vistos ao microscópio, após coloração de Gram. **São aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase negativa** (Forbes & Sahm, 2004) (Washington Jr. et al, 2006) (Poeta & Rodrigues, 2008-2009) (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999).

Os géneros que fazem parte desta família são *Streptococcus* spp. e *Lactococcus* spp.. Destes microrganismos, os mais encontrados em infecções humanas são os *Streptococcus* spp., nomeadamente: *S.pyogenes* (ou estreptococos do grupo A de Lancefield), *S.agalactiae* (ou estreptococos do grupo B de Lancefield), *S.pneumoniae* e *S.viridans* (Forbes & Sahm, 2004).

S.pyogenes (β -hemolítico) é um patogénico que causa amigdalite bacteriana nas crianças dos 5 aos 10 anos de idade (Fonseca et al., 2004).

S.agalactiae (gama ou β -hemolítico) cujo despiste é importante no 3º trimestre de gravidez, para prevenir a infecção neonatal que pode ocasionar quadros graves de septicémia e meningite (Forbes & Sahm, 2004) (Poeta & Rodrigues, 2008-2009).

S.pneumoniae (α -hemolítico), é a principal causa de pneumonia da comunidade e frequente causa de pneumonia, meningite, otite e sinusite, contudo o microrganismo pode residir sem provocar danos nas vias respiratórias superiores (Forbes & Sahm, 2004) (Fonseca et al., 2004).

S.viridans, (gama ou α -hemolítico), consideram-se em geral patogénicos oportunistas de baixa virulência. São microrganismos frequentemente envolvidos em endocardite bacteriana (Forbes & Sahm, 2004).

(ver morfologia típica de Estreptococos em apêndice 7)

1.9.2.4 Bacilos Gram positivo

Dos microrganismos que se apresentam sob a forma de bacilos Gram positivo, aqueles que mais frequentemente são isolados em amostras clínicas são os pertencentes aos géneros: *Listeria* e *Corynebacterium* (Mena & et al, 2004).

Contudo, durante este estágio apenas foi detectada a presença de *Corynebacterium* spp.

Corynebacterium spp. pode ser **aeróbio ou anaeróbio facultativo, fermentadoras de glicose e outros carboidratos e , na sua maioria são catalase positiva** (Oliveira & et al, 2005).

Estas bactérias encontram-se amplamente distribuídas na natureza (solo e água) e fazem parte da flora da pele e mucosas do homem. Os isolamentos em produtos biológicos de bactérias deste género, são geralmente considerados contaminantes. No entanto, o seu repetido isolamento sugere a sua implicação na etiologia do processo infeccioso (Washington Jr. et al, 2006) (Oliveira & et al, 2005).

(ver morfologia típica de *Corynebacterium* spp. em apêndice 8)

1.9.3 Outros microrganismos

Além dos microrganismos anteriormente mencionados detectou-se também a presença de leveduras. (ver apêndice 9)

Para as leveduras é realizado, neste laboratório, um teste de germinação, que permite concluir se estamos perante *C.albicans* (germinação positiva). É ainda utilizado o sistema automático de identificação, quando se justifica (ex:hemoculturas).

Também foi possível a observação de outros microrganismos presentes em amostras clínicas, que não as urinas, como é o caso de *Haemophilus influenzae* (coco-bacilo Gram negativo), muito frequente em exsudados oculares.

Para detecção deste microrganismo além do exame directo (coloração de Gram) e exame cultural (gelose Sangue e Chocolate) utilizam-se testes de identificação:

- teste de demonstração da exigência dos factores de crescimento hemina (X) e/ou Nicotinamida adenina dinucleotídeo-NAD (V). *Haemophilus influenzae* exige a presença de ambos para o seu desenvolvimento, não crescendo quando apenas se encontra presente um dos factores (Forbes & Sahm, 2004) (Fonseca et al., 2004).
(ver apêndice 10)
- sistemas automatizados

2. Parte Experimental:

2.1 Materiais, Equipamentos e Reagentes:

Equipamentos:

- ✓ Previ-Color Gram: coloração automática de Gram, da Biomérieux
- ✓ Microscópio Óptico Olympus BX41: Microscópio com ocular de 10x e quatro objectivas diferentes, 10x, 20x, 40x e 100x.
- ✓ Bact/Alert 3D 120: sistema automatizado para Hemoculturas e Micobactérias (Biomérieux).
- ✓ Vitek2 compact (BioMérieux): sistema automatizado para identificação de bactérias e antibiograma
- ✓ Camara de segurança biológica (classe II): para protecção do operador e segurança no processamento de amostras.
- ✓ Estufa (ar ambiente) e estufa de CO₂

Materiais:

- ✓ Meios de cultura da BioMérieux.
- ✓ Ansas calibradas de 1µl e 10µl, de Sarstedt
- ✓ Zaragatoas, de APTACA.
- ✓ Lâminas Normax: Lâminas com bordos esmerilados com dimensões 76x26 mm e espessura 0,95x1,05 mm.
- ✓ Lamelas Normax: dimensões 22x22 mm e espessura 0,13x0,17 mm.
- ✓ BD BBL DRYSlide: Discos impregnados com reagente oxidase de diâmetro 6mm, para a prova da oxidase.
- ✓ Kit slidex staph plus: teste de identificação presuntiva de *S.aureus*, para prova da coagulase, da Bio-Rad.
- ✓ Aplicador automático de discos de antibióticos em placas de agar (90 e 150mm), para realização de antibiogramas pelo método de Kirby-Bauer
- ✓ Densimat: Medidor de densidade para antibiogramas realizados pelo método de Kirby-Bauer: (BioMérieux)
- ✓ Materiais para Vitek2-Compact:
 - Cartas de identificação
 - Cartas para antibiogramas
 - Tubos polisterino
 - Dispensador de solução salina
 - Aparelho de densidades DensiCHEK
- ✓ Nos procedimentos experimentais foi ainda utilizado material corrente de laboratório, Micropipetas e geradores de microaerofilia e anaerobiose da BioMérieux

Reagentes:

- ✓ Reagente Kovacs, para o teste da Ureia/Indol (BioMérieux)
- ✓ Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂) para catalase
- ✓ Solução salina da BioMérieux, para Vitek2-Compact
- ✓ Reagentes para coloração de Ziehl-Neelsen:
 - Fucsina: Reagente de Kinyoun (BioMérieux)
 - Álcool-Ácido (970ml álcool etílico 96% ; 30 ml de HCl)
 - Azul de Metileno: Solução de Gabett (BioMérieux)
- ✓ Reagentes para Previ-color Gram:
 - Previ-Color Gram Solução de Violeta de Cristal, da bioMérieux
 - Previ-Color Gram Solução de Iodo, da bioMérieux
 - Previ-Color Gram Solução de Acetona-Fucsina, da bioMérieux

2.2 Procedimento Experimental

2.2.1 Trabalho 1: Estudo estatístico das várias amostras biológicas

2.2.1.1 Processamento das várias amostras

Urina

Exame cultural

- ✓ Após homogeneização, a amostra é semeada com ansa calibrada de 1µl, utilizando a técnica de sementeira em estrias⁴.
- ✓ Meios de cultura: gelose Sangue e MacConkey (a gelose Sangue é substituída por gelose CNA nos algaliados)
- ✓ As placas são incubadas durante um período de 18-24 horas a 36°C±1 em aerobiose;

Exame directo

- Exame de esfregaço da urina pela coloração de Gram
- ✓ Com a ajuda de uma pipeta de pasteur, colocar uma gota de urina previamente homogeneizada e não centrifugada na lâmina, sem a espalhar (técnica de esfregaço de líquidos).
- ✓ Esperar que a gota seque e fixar à chama (bico de bunsen)
- ✓ Proceder à coloração
 - Exame directo a fresco do sedimento urinário
- ✓ Centrifugação a 1800 rpm durante 5 minutos. Decantar e utilizar o sedimento para fazer exame citológico.
- ✓ Avaliação semi-quantitativa da presença de elementos celulares tais como células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, e microrganismos (bactérias, fungos e parasitas).

⁴ Depositar a amostra no meio de cultura através de uma estria ao meio da placa. Realizar estrias perpendiculares à primeira estria, rodar a placa 90° e fazer novamente estrias.

Sangue

Exame cultural

A amostra de sangue venoso colhida e inoculada directamente no meio líquido para hemocultura em aerobiose é introduzida no equipamento automático (Bact/ALERT 3D), por leitura de código de barras. Se o aparelho detectar alguma positividade é emitido um sinal e o frasco é retirado. As negativas mantêm-se em incubação até ao 5º dia, findo os quais são assinaladas como negativo e retiradas.

Exame cultural (Hemocultura positiva):

- ✓ São efectuadas passagens para meios de cultura:
- ✓ Agitar suavemente o frasco.
- ✓ Inserir uma agulha para ventilar o frasco e colocar posteriormente uma seringa na agulha para retirar aproximadamente 1ml.
- ✓ Colocar uma gota em cada um dos seguintes meios: gelose CNA, gelose Chocolate e MacConkey.
- ✓ Efectuar a sementeira em quadrantes⁵ com a ajuda de uma ansa descartável.
- ✓ Incubar a gelose de Chocolate e CNA em atmosfera de aerobiose rica em CO₂ e MacConkey em aerobiose durante 18-24 horas a 36°C ±1. Voltar a incubar a gelose CNA e a gelose Chocolate até 48 horas, se não houver crescimento às 24 horas.

Exame directo:

- ✓ É efectuado esfregaço⁶ para coloração pelo método de Gram, cuja observação pode constituir informação importante como resultado preliminar.

Ponta de cateter vascular

Deve ser enviada hemocultura acompanhante colhida de veia periférica 30 minutos antes da retirada do cateter. É critério de rejeição o não cumprimento desta norma.

Exame cultural:

- ✓ Colocar o cateter em gelose Chocolate assépticamente com o auxílio de uma ansa.
- ✓ Fazer o cateter rodar sobre a superfície do meio
- ✓ Incubar a 36°C±1 em atmosfera de aerobiose rica em CO₂, até 48 horas.

Amostras provenientes do aparelho reprodutor:

Exame cultural

- ✓ Utiliza-se a técnica de sementeira em quadrantes, em gelose Chocolate e Sabouraud.
- ✓ Podem ainda ser utilizados outros meios, além destes, em casos específicos:
 - Granada: despiste de *S.agalactiae*, solicitado no 3º trimestre de gravidez.
 - VCAT: perante suspeita clínica de *N.gonorrhoeae*

⁵ Depositar a amostra no meio de cultura através da realização de várias estrias num primeiro quadrante (sem levantar a ansa do meio). Realizar estrias nos quadrantes seguintes, tocando sempre com a ansa nas estrias do quadrante anterior.

⁶ Colocar uma gota de sangue na extremidade da lâmina, em seguida posicionar uma segunda lâmina junto dessa gota com uma inclinação de sensivelmente 45°, e fazer correr esta segunda lâmina sobre a primeira.

- ✓ Incubar durante, 18-24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$, a gelose Chocolate, VCAT e Granada em atmosfera de aerobiose rica em CO_2 , e a gelose sabouraud em atmosfera de aerobiose.

Exame directo

- ✓ Efectuar um esfregaço de zaragatoa⁷ e corar pela técnica de Gram.

Fezes

Por rotina, são efectuadas pesquisas de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp.

Exame macroscópico

- ✓ Devem ser registados todos os aspectos macroscópicos importantes, tais como: fezes moldadas ou diarreicas, mucosas, sanguinolentas.

Exame cultural

- ✓ Deve-se seleccionar uma porção com muco e/ou sangue.
- ✓ Semear em quadrantes, usando uma ansa descartável, nos seguintes meios: Hektoen, MacConkey com sorbitol, Yersinia e Campyloset.
- ✓ Incubar gelose Campyloset a 42°C em microaerófilia durante 48 horas, e os restantes em aerobiose, durante 18-24 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$
- ✓ Colocar o resto da amostra em caldo GN.
- ✓ Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ em aerobiose, durante 6 horas e fazer a subcultura para gelose Hektoen.

Amostras provenientes das vias respiratórias

Exame cultural

- Expectoração, secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar
- ✓ Fazer sementeira utilizando a técnica em quadrantes, nos seguintes meios: gelose Chocolate, CNA, e MacConkey.
- ✓ Incubar os meios gelose Chocolate e CNA em atmosfera de aerobiose rica em CO_2 e o meio de MacConkey em aerobiose, durante 18-24 horas a uma temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 1$.
- Exsudado Nasal – pesquisa de *Staphylococcus aureus* (portador)

Vigilância epidemiológica – pesquisa de *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA)

- ✓ Fazer sementeiras, utilizando a técnica em quadrantes nos meios: MRSA e CNA
- ✓ Incubar os meios em atmosfera de aerobiose rica em CO_2 durante 18-24 horas, a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$.
- Exsudado faríngeo
- ✓ Utilizar também a técnica de sementeira em quadrantes, para fazer o cultivo deste produto em CNA .
- ✓ Semear em meio líquido (caldo de Todd Hewitt), subcultura após incubação de 24 horas para gelose CNA
- ✓ Incubar em atmosfera de aerobiose rica em CO_2 durante um período de 18-24h, a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$.

⁷ Rodar a zaragatoa para a frente e para trás em áreas contíguas da lâmina.

Exame directo

- Expectoração, secreções brônquicas e lavado bronco-alveolar
- ✓ Exame macroscópico da amostra e escolha da porção purulenta para execução de esfregaço
- ✓ Fazer duas lâminas por técnica de esmagamento⁸
- ✓ Corar pela técnica de Gram e Ziehl-Neelsen (quando solicitado pesquisa de bacilos álcool-ácido resistente, por suspeita de Tuberculose.)

Exsudado cutâneo, ferida, escara e auricular externo

Exame cultural

- ✓ Semear em quadrantes, utilizando a zaragatoa com a amostra para realizar o primeiro depósito nos seguintes meios: MRSA (apenas para exsudado cutâneo), MacConkey, CNA e Chocolate.
- ✓ Em seguida utilizam-se ansas descartáveis para realização dos quadrantes seguintes.
- ✓ Incubar os meios de Chocolate, MRSA e CNA em atmosfera de aerobiose rica em CO₂, e MacConkey em aerobiose, durante 18-24 horas a 36°C ±1

Exame directo

- ✓ Fazer lâmina por rolamento de zaragatoa
- ✓ Corar por Gram

Exsudado Ocular

Exame cultural:

- ✓ Semear em quadrantes nos seguintes meios: gelose de Sangue e gelose Chocolate.
- ✓ Em seguida utilizar ansas descartáveis para realizar os quadrantes seguintes.
- ✓ Incubar o meio gelose Chocolate em atmosfera de aerobiose rica em CO₂ e gelose Sangue em aerobiose, durante 24-48 horas a 36°C ±1.

Exame directo:

- ✓ Fazer lâmina por rolamento de zaragatoa
- ✓ Corar por Gram.

Líquidos corporais

Exame cultural:

- ✓ Retirar 2 a 3ml de líquido, com a ajuda de uma seringa.
- ✓ Colocar uma gota em gelose Chocolate e semear em quadrantes.
- ✓ Incubar o meio em atmosfera de aerobiose rica em CO₂ durante 24-72 horas a 36°C ±1.
- ✓ Inocular em meio líquido de enriquecimento (Hemoline), incubar a 36°C ±1, em aerobiose

Exame directo:

- ✓ Esfregaço corado pelo método de Gram (técnica de esfregaço de líquidos)

⁸ Depositar amostra sobre a lâmina e pressionar com uma segunda lâmina. Deslizar suavemente as lâminas em direcções opostas.

- ✓ Esfregaço corado pelo método de Ziehl-Neelsen: no caso de pesquisa de Bacilos Álcool-Ácido resistentes. (técnica de esfregaço de líquidos)

2.2.1.2 Procedimento efectuado para colorações

Para qualquer coloração é necessário iniciar com os seguintes procedimentos:

- ✓ Depositar a amostra na lâmina
- ✓ Esperar que seque e fixar à chama (bico de bunsen)

Coloração de Gram utilizando o aparelho Previ-color Gram

- ✓ Colocar os esfregaços previamente fixados no aparelho e esperar que este complete o ciclo de coloração.

Coloração de Ziehl-Neelsen

- ✓ Cobrir a lâmina com solução de Fucsina e aquecer, passando uma chama no lado oposto da lâmina, até à emissão de vapores;
- ✓ Deixar actuar o corante durante 15 minutos;
- ✓ Lavar a lâmina com água corrente;
- ✓ Cobrir novamente a lâmina, mas agora com álcool-ácido
- ✓ Lavar a lâmina com água corrente;
- ✓ Corar com azul de metileno durante 20 segundos;
- ✓ Lavar com água corrente e esperar que seque.
- ✓ Observar ao microscópio óptico.

2.2.2 Trabalho 2: Uroculturas

Após a recepção das amostras de urina são efectuados os seguintes procedimentos:

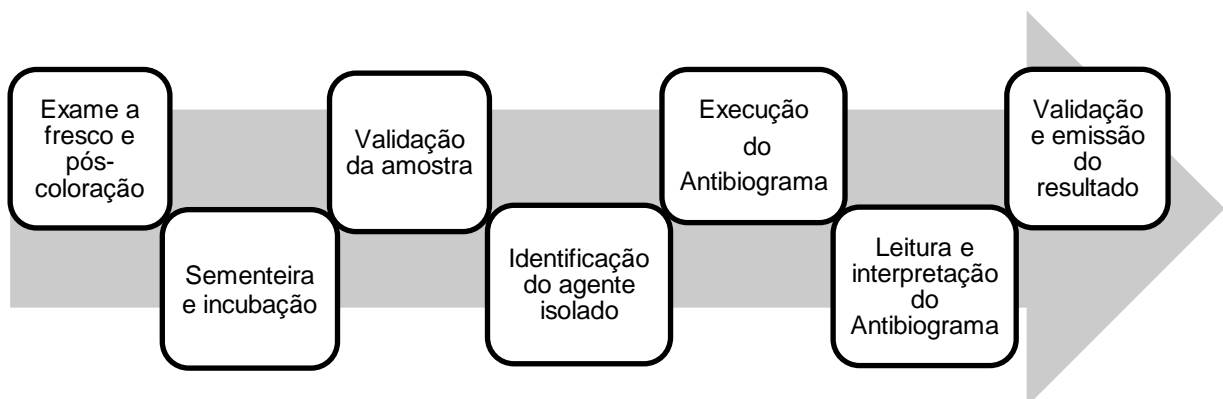


Figura 2. 1 Fluxograma com procedimento efectuado em urinas

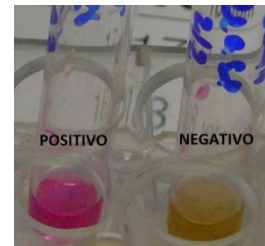
O exame a fresco, a coloração de Gram, a sementeira e incubação são realizados tal como descrito na primeira parte do estudo.

Para validação da amostra temos em conta a avaliação a fresco, a coloração de Gram, a presença de culturas puras e o número de ufc/ml.

Para identificação do microrganismo isolado, são realizados vários testes/provas, que juntamente com outros dados (ex:crescimento em determinado meio de cultura), vão permitir a identificação do microrganismo.

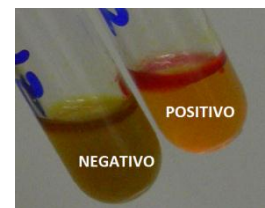
Prova da Urease

- ✓ Transferir uma porção do crescimento bacteriano, para um meio contendo ureia e um indicador de pH (vermelho de fenol);
- ✓ Incubação a 36°C ±1 por 18 a 24 horas.
- ✓ Resultado positivo: alteração da cor do meio (amarelo) para rosa;
- ✓ Resultado negativo: ausência de alteração de cor.



Prova do Indol

- ✓ Utilizar o tubo que contem o resultado da prova da urease;
- ✓ Colocar uma gota de reagente kovacs;
- ✓ Resultado positivo: Quando se forma anel rosa à superfície do meio
- ✓ Resultado negativo: Quando se forma anel de qualquer outra tonalidade.



Prova da Oxidase

- ✓ Retirar do meio, uma colónia com a ajuda de uma ansa descartável;
- ✓ Espalhar a colónia sobre o disco impregnado que já contém o reagente de oxidação (BD Dryslide Oxidase- slidex)
- ✓ Resultado positivo: aparecimento em 20 segundos de uma coloração que vai de violeta a púrpura;
- ✓ Resultado negativo: reacções tardias, ou a ausência de cor, indicam um teste negativo.



Prova da Catalase

- ✓ Depositar uma gota de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) numa lâmina de vidro;
- ✓ Colocar uma colónia sobre esta gota;
- ✓ Resultado positivo: quando há efervescência devido à libertação de oxigénio;
- ✓ Resultado negativo: não há efervescência.



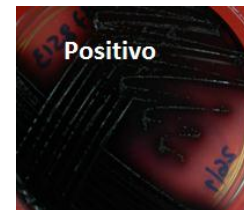
Prova da Coagulase

- ✓ Dispensar uma gota de reagente patorex: staph-plus (vermelho), num dos círculos da placa de reacção (disponível com o kit);
- ✓ Colocar uma gota de reagente de controlo positivo (*S. Aureus*: ATCC 29213) noutra círculo;
- ✓ Adicionar 1-3 colónias em cada uma das gotas;
- ✓ Resultado positivo: formam-se partículas vermelhas isoladas (agregação)
- ✓ Resultado negativo: não se formam as partículas.



Hidrólise de Esculina

- ✓ Utilizar uma ansa de plástico para colocar uma porção de colónias no meio;
- ✓ semear em quadrantes
- ✓ Resultado positivo: o meio apresenta uma tonalidade escura;
- ✓ Resultado negativo: o meio não altera a sua cor.



Teste de CAMP

- ✓ Colocar no centro da placa de ágar de sangue (horizontalmente) uma estria de β -hemolisina produzida por *S.aureus* comercial (Controlo positivo : *S. aureus* ATCC 29213)
- ✓ Inocular perpendicularmente ao *S.aureus* o estreptococo a testar, tendo o cuidado para não interseccionar com o *S.aureus*
- ✓ Incubar em aerobiose 36°C \pm 1, durante 18-24 horas
- ✓ Resultado positivo: quando a β -hemólise se apresenta sob a forma de flecha;
- ✓ Resultado negativo: a β -hemólise não apresenta esta forma.



(Ver possíveis resultados dos testes de identificação em apêndice 12)

Sistema automatizado

- Procedimento utilizado em Cartas de identificação para Vitek2
- ✓ Encher tubos de vidro com 3ml de solução tampão;
- ✓ Colocar uma colónia nesta solução, com a ajuda de uma zaragatoa;
- ✓ Agitar no vortex;
- ✓ Observar a densidade da solução que deve estar entre :
 - 0,50 e 0,63 Mcf (Mcfarland) para Gram negativo e Gram positivo;
 - 1,8 e 2,2 Mcf para leveduras;
 - 2,7 e 3,3 Mcf para *Corynebacterium* sp.
- ✓ Colocar no aparelho para que seja identificado o microrganismo.

Depois de identificado o microrganismo, pode então proceder-se à realização do antibiograma. Este pode ser feito por dois métodos: através de sistema automatizado – Vitek 2 compact, ou através do método manual de Kirby-Baüer.

Sistema automatizado

- ✓ Pipetar 145µl da solução preparada para carta de identificação;
- ✓ Colocar a solução pipetada em outro tubo que já continha 3ml de solução tampão;
- ✓ Colocar carta de identificação em contacto com esta solução, através de um tubo de aspiração ligado à carta;
- ✓ Colocar todo este conjunto no aparelho.

Método de Kirby-Baüer:

- ✓ O meio de cultura e os discos de antimicrobianos devem ser armazenados no frio (2 a 8°C) e retirados deste para arrefecer à temperatura ambiente antes de serem usados;
- ✓ Se o meio apresentar excesso de humidade na superfície, as placas devem ser colocadas numa estufa (36°C ±1), até que o excesso de humidade evapore (normalmente entre 10 a 30 minutos);
- ✓ Colher colónias puras e isoladas, com o auxílio de uma ansa, e suspender em solução fisiológica estéril;
- ✓ Comparar a suspensão com a escala 0,5 de McFarland de turvação;
- ✓ Realizar inoculação no meio de cultura (Müller-Hinton)
- ✓ Colocar os discos de antibiótico com a ajuda de um dispensador, pressionando suavemente contra o meio, de modo a garantir que permaneçam fixos no local de aplicação. Depois de colocados, os discos não devem ser removidos.
- ✓ As placas são incubadas por 16- 24 horas, em aerobiose, a 36°C ±1.
- ✓ Para o TSA de *Staphylococcus* spp., o disco da oxacilina e cefoxitina, devem ser incubados a temperaturas mais baixas, aproximadamente 30°C.

Após o crescimento procede-se à realização da leitura e interpretação de antibiograma:

- ✓ **Medição dos halos:** efectuar a leitura por observação directa do halo de inibição (área sem crescimento) e, com o auxílio de uma régua, fazer a medição do diâmetro. Comparar com o valores consenso de CLSI, para dar o resultado de Resistente/Intermédio ou Sensível.
- ✓ **Leitura e interpretação do antibiograma:** ter em conta os diferentes fenótipos das bactérias. Durante este procedimento verificar se a técnica foi bem executada: Num inóculo bem executado, os halos de inibição resultantes serão uniformemente circulares e haverá um tapete confluyente de crescimento. Se se observarem colónias individuais, o inóculo foi demasiado leve e o teste deverá ser repetido. No caso de crescimento evidente de colónias dentro de um halo de inibição, deverá ser feita a repetição do teste. Se o crescimento das colónias persistir, deve ser medido o halo de inibição livre de colónias. Em alguns *Proteus*

spp. pode-se observar um véu de crescimento dentro do halo de alguns antibióticos que deve ser ignorado. É importante o conhecimento dos mecanismos de resistência, e atenção aos diferentes fenótipos de resistência bacteriana (natural e adquirida) de forma a permitir uma validação correcta dos resultados do antibiograma.

Concluídos estes processos, analisam-se todos os seus resultados em simultâneo, e se não levantarem qualquer suspeita de erro, a amostra é validada e enviada para o clínico através de um sistema computadorizado.

Resumindo os passos anteriormente descritos, os microrganismos isolados são identificados segundo os fluxogramas que se seguem:

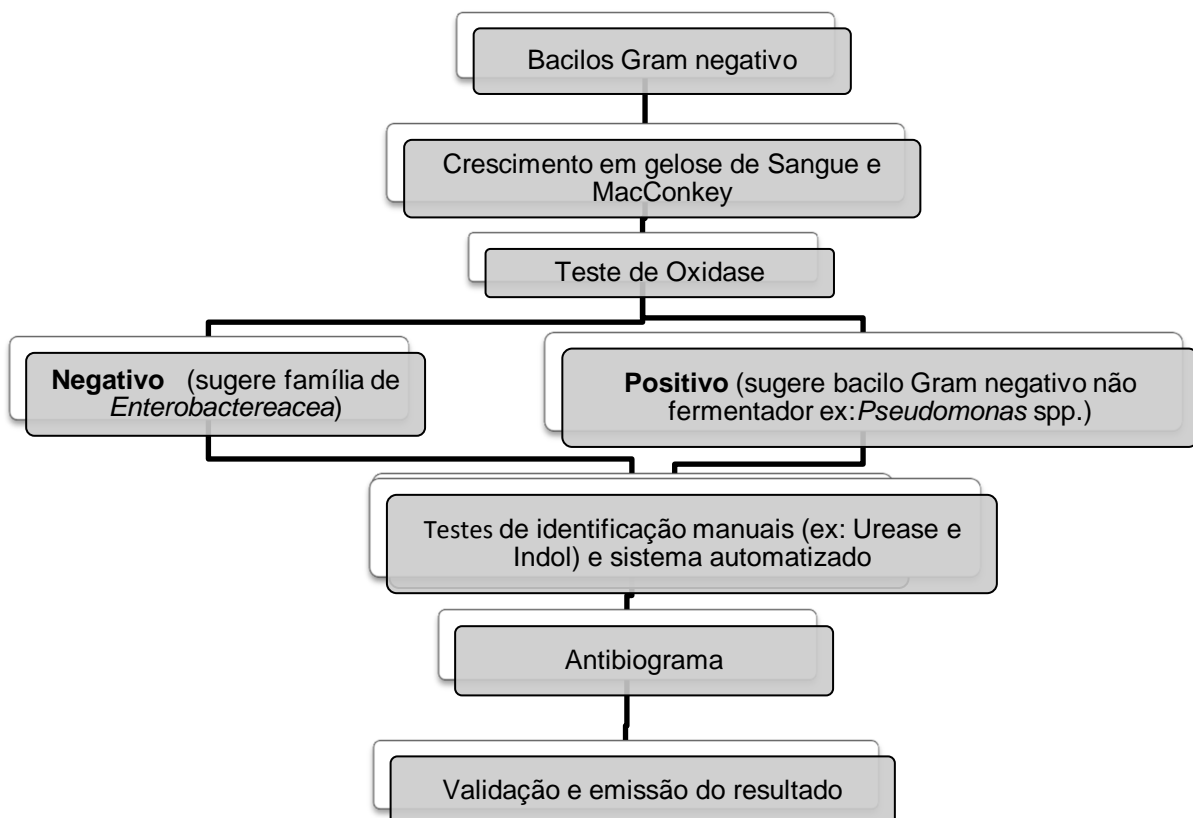


Figura 2. 2 Fluxograma de Bacilos Gram negativo

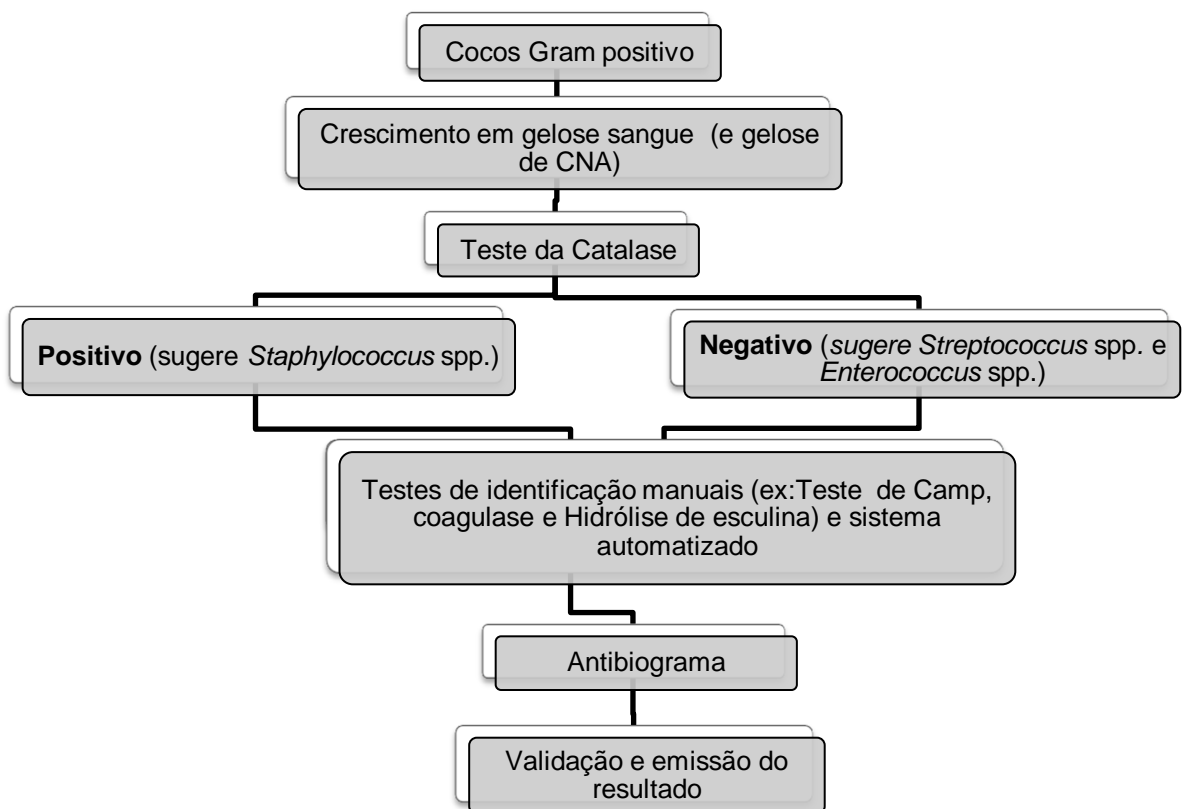


Figura 2. 3 Fluxograma de cocos Gram positivo

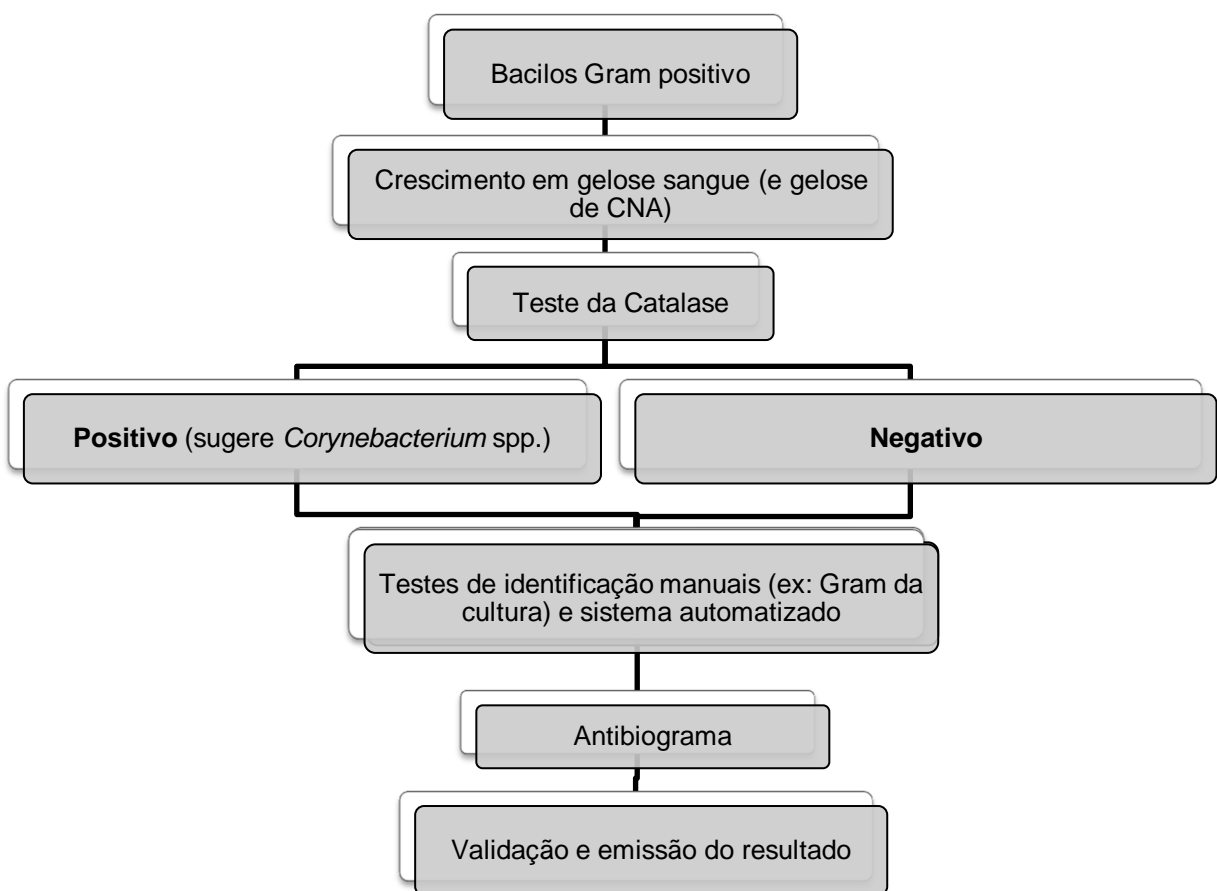


Figura 2. 4 Fluxograma de bacilos Gram positivo

Esta página foi propositadamente deixada em branco

3. Resultados e Discussão

3.1 Trabalho 1: Estudo estatístico das várias amostras biológicas

Durante o estágio de seis meses realizado no laboratório de microbiologia (outubro 2011- março 2012), foram analisados 9092 produtos biológicos. Uma avaliação estatística de todos os produtos, permitiu concluir acerca do produto mais frequentemente analisado neste laboratório.

Tabela 3. 1 Produtos biológicos analisados durante o período de estágio (outubro 2011- março 2012)

Produto	total
Urina	3294
Sangue	2288
Amostras das Vias respiratórias	1405
Amostras do Aparelho reprodutor	668
Fezes	614
Exsudado cutâneo	425
Líquidos corporais	345
Exsudado ocular	53
TOTAL	9092

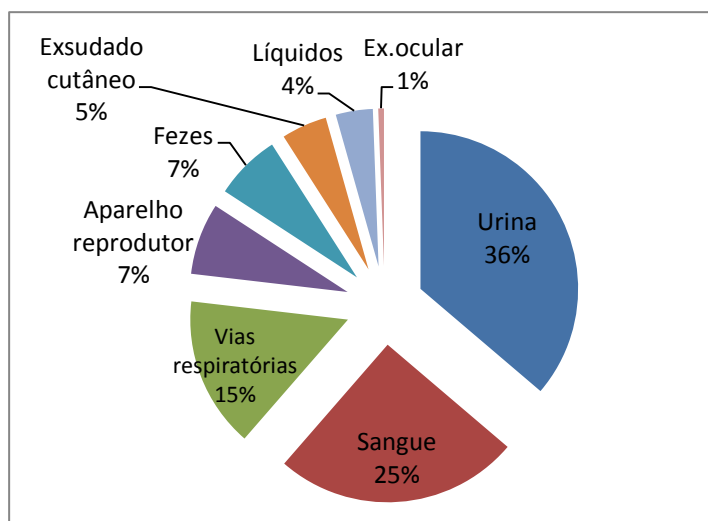


Gráfico 3. 1 Percentagens de produtos biológicos analisados durante o período de estágio

Tabela 3. 2 Produtos biológicos analisados de janeiro a junho de 2011

Produto	total
Urina	3409
Sangue	2478
Amostras das Vias respiratórias	1883
Amostras do Aparelho reprodutor	756
Fezes	656
Exsudado cutâneo	340
Líquidos corporais	270
Exsudado ocular	60
TOTAL	9852

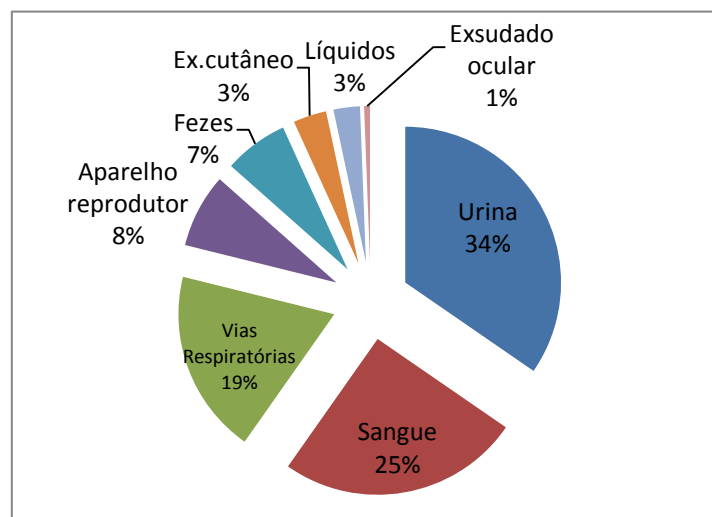


Gráfico 3. 2 Percentagens de produtos biológicos analisados de janeiro a junho de 2011

Observando os dados anteriores (gráfico 3.1 e tabela 3.1), verifica-se que o produto biológico mais analisado durante o período de estágio foi a urina com 36% (n=3294). Este resultado está de acordo com a literatura, pois as infecções urinárias encontram-se entre as que mais levam os pacientes a consultas médicas. Estima-se que cerca de 10% dos seres humanos sofrem uma infecção urinária em alguma altura da sua vida (Forbes & Sahm, 2004) (Camargo & et al, 2001) (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

De janeiro a junho de 2011 foram analisados 9852 produtos biológicos, e foi verificado mais um dado a favor de que as urinas são realmente o produto mais analisado.

Também o sangue foi uma amostra analisada com alguma frequência (25%), sendo o segundo exame mais frequente neste estudo. A invasão microbiana da corrente sanguínea pode ter graves consequências, como choque, insuficiência de múltiplos órgãos, coagulação intravascular e morte. Isto dá-nos a indicação de que a invasão da corrente sanguínea é uma das infecções mais graves, e por conseguinte, a rápida detecção e identificação dos patogénios transportados pelo sangue é uma das funções do laboratório de microbiologia (Forbes & Sahm, 2004).

As amostras provenientes das vias respiratórias também foram analisadas com alguma regularidade (15%), o que corrobora outros trabalhos descritos. Segundo os mesmos, estes produtos são analisados com bastante frequência, mas ainda assim, menos que as urinas e o sangue (Jorgetto & et al, 2005).

Os produtos provenientes do aparelho reprodutor foram unicamente do sexo feminino e corresponderam a 7% dos analisados. O exsudado vaginal foi o mais requisitado, pois trata-se de um exame importante no diagnóstico pré-natal para despiste de mulheres portadoras de *S.agalactiae* (estreptococos do grupo B de Lancefield), no 3º trimestre da gravidez, como prevenção da infecção neonatal.

As doenças diarreicas são, por todo o mundo, uma importante causa de morte, especialmente em crianças com idade inferior a 5 anos (Forbes & Sahm, 2004).

As fezes constituem 7% das amostras analisadas, à semelhança do que se verificou para as amostras provenientes do aparelho reprodutor. Desta forma, este tipo de amostra surge como o quinto produto mais analisado.

Outros Produtos biológicos relacionados como exsudado cutâneo, exsudado ocular e líquidos corporais, são menos frequentes, apresentando por isso uma menor afluência de análise neste laboratório.

Finalmente, analisando o tabela 3.1 em simultâneo com o tabela 3.2, observa-se que a ordem dos produtos analisados se mantém inalterável, independentemente da altura do ano em estudo.

3.2 Trabalho 2: Uroculturas

Durante um período de três meses (de 1 janeiro de 2012 a 31 março de 2012), foram analisadas 1408 amostras de urina provenientes de pacientes do sexo feminino e masculino, que se apresentaram nos diferentes serviços hospitalares. Desta análise, 36 % (n=500) apresentaram resultado positivo (uroculturas positivas).

Tabela 3. 3 Resultados positivos e negativos

Urinas	Resultados
Negativos	908
Positivos	500
total	1408

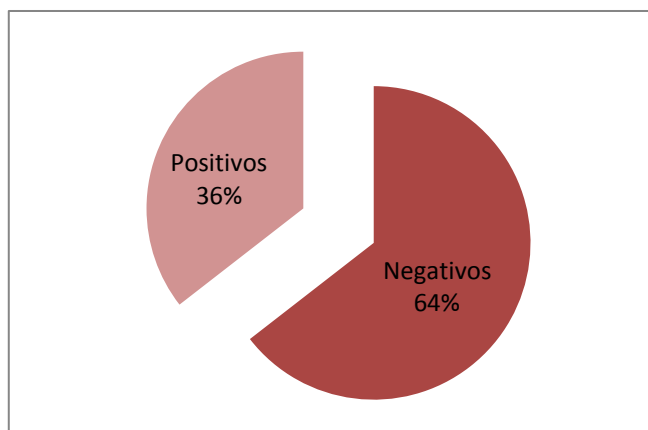


Gráfico 3. 3 Percentagens de resultados positivos e negativos

O predomínio das uroculturas positivas ocorreu no sexo feminino com 68% dos casos (gráfico 3.4), assemelhando-se assim a vários trabalhos já descritos (Muller & et al, 2008) (Kazmirczak & et al., 2005) (Menin & et al., 2010).

Tabela 3. 4 Resultados positivos consoante o sexo.

Sexo	Resultados
Feminino	341
Masculino	159
total	500

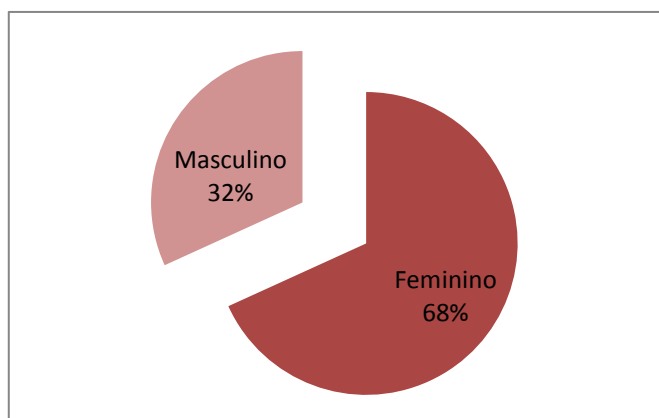


Gráfico 3. 4 Percentagens de resultados positivos consoante o sexo

Este predomínio pode ser explicado pelo facto das mulheres serem mais susceptíveis a este tipo de infecção, devido à estrutura anatómica do aparelho urinário (uretra curta e proximidade com o ânus). O facto de nos homens a incidência ser menor (32%), pode ser explicado pelo maior comprimento uretral, maior fluxo urinário e pela presença de antibacteriano prostático (Muller & et al, 2008).

Além desta diferença entre sexos, foi também verificada uma diferente distribuição por grupo etário.

Tabela 3. 5 Percentagens de uroculturas positivas no sexo masculino por grupo etário.

Grupo etário	Percentagens
≤1	2,4
2-10	1,2
11-20	0,0
21-30	0,0
31-40	0,4
41-60	2,2
61-80	14,2
≥ 81	11,4
Total	32

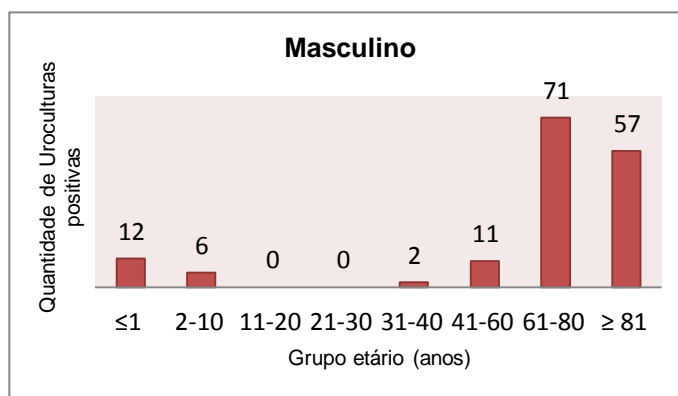


Gráfico 3. 5 Uroculturas positivas no sexo masculino por grupo etário

Através da observação dos valores anteriores (Gráfico 3.5 e Tabela 3.5), verifica-se que para crianças com idade inferior a 1 ano, o resultado de uroculturas positivas no sexo masculino foi 2,4% (n=12), e que há medida que a idade da criança aumentou (2-10anos), ocorreu uma diminuição para 1,2% (n=6). Entre os 11 e os 30 anos não se obtiveram uroculturas positivas, voltando estas a surgir a partir dos 31 anos.

Tabela 3. 6 Percentagens de uroculturas positivas no sexo feminino por grupo etário

Grupo etário	Percentagens
≤1	2,0
2-10	6,4
11-20	3,8
21-30	4,0
31-40	5,6
41-60	8,8
61-80	21,0
≥ 81	16,6
Total	68

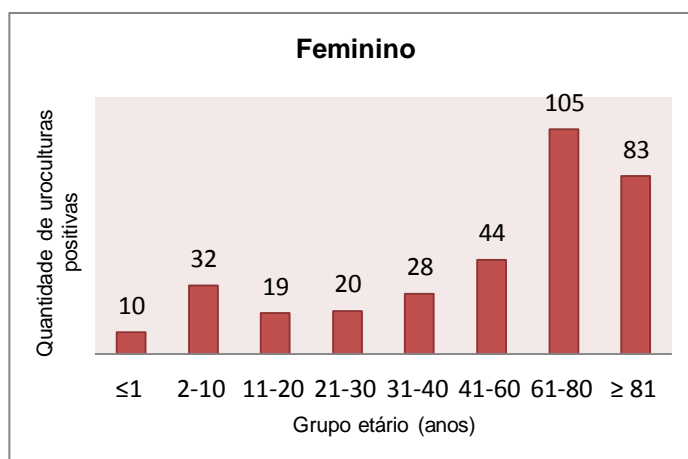


Gráfico 3. 6 Uroculturas positivas do sexo feminino por grupo etário

Nos valores apresentados no gráfico 3.6 e tabela 3.6, observa-se que, para o sexo feminino, o número de uroculturas positivas em idades inferiores a 1 ano , foi de 2,0% (n=10), menos 0,4% do que o verificado para o sexo masculino. Este resultado pode estar relacionado com a presença de mal formações congénitas no sexo masculino, que são mais frequentes neste sexo (Kazmirczak & et al., 2005).

Verificou-se também que foram encontrados resultados positivos em todas as faixas etárias, ao contrário do que aconteceu no sexo masculino, e que a incidência tem tendência a aumentar significativamente com a idade. Todos os grupos etários, com excepção do já referido grupo de

idades inferiores a 1 ano, apresentaram percentagens superiores às obtidas para o sexo masculino, isto é, as uroculturas positivas foram predominantes no sexo feminino.

Estudos prévios mostraram que a incidência de bacteriúria (presença de bactérias na urina) no sexo feminino aumenta gradualmente com a idade (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007). O que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

A predominância de uroculturas positivas no sexo feminino está relacionada, tal como já referido, com a estrutura anatómica do aparelho urinário da mulher, agravando-se ainda com a junção de outros factores, tais como:

- Em idades entre os 20 e os 40 anos, a probabilidade de uma infecção reincidir em 1 ano é de 50%;
- A associação das ITU com relações sexuais também está relacionada com o aumento da incidência, devido à possível introdução de bactérias na uretra feminina;
- Também a gravidez aumenta a incidência de bacteriúria, devido a alterações anatómicas e hormonais. Estas alterações podem levar a infecções graves em ambos, mãe e feto (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

Observa-se ainda que em ambos os sexos, as uroculturas positivas foram mais frequentes para indivíduos com idade acima dos 60 anos (63,2% : ver cálculo em apêndice 13), tal como se verificou em outros estudos (Muller & et al, 2008) (Kazmirczak & et al., 2005) (Menin & et al., 2010) (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

Estes resultados podem estar relacionados com a presença de cálculos urinários e doença prostática, que obstruem o fluxo urinário causando esvaziamento vesical incompleto e consequentemente a infecção urinária (Kazmirczak & et al., 2005) (Muller & et al, 2008).

Das 500 amostras de urina com resultado positivo, foi possível isolar 22 tipos diferentes de microrganismos, incluindo leveduras. Estes microrganismos, bem como o respectivo número de isolamentos, são evidenciados no gráfico 3.7.

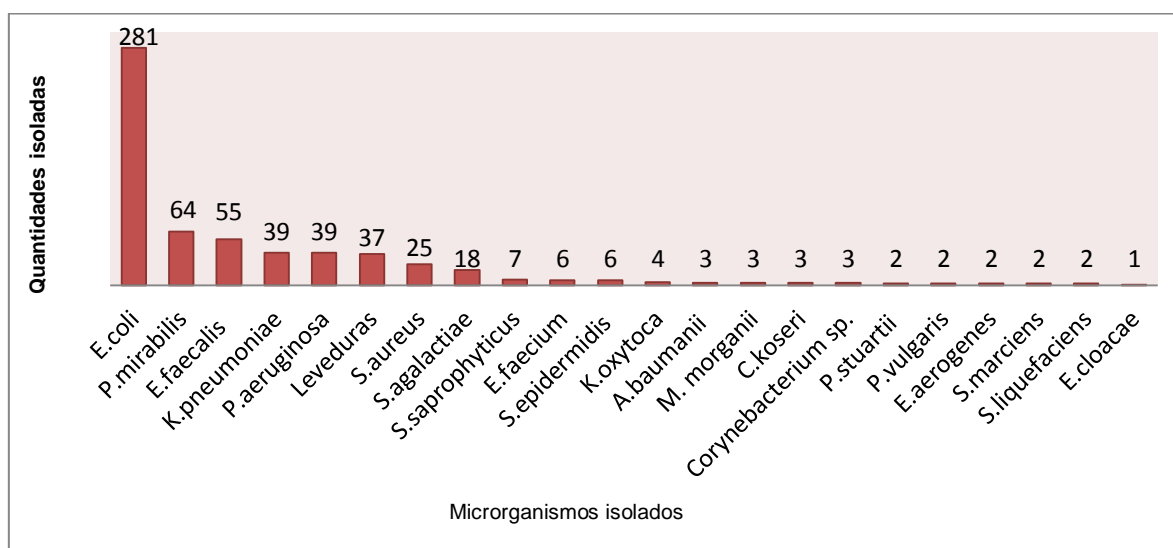


Gráfico 3. 7 Distribuição dos microrganismos isolados nas amostras de urina

Os microrganismos isolados com maior frequência, foram :

- *Escherichia coli* com 46,5% (n=281);
- *Proteus mirabilis* com 10,6% (n=64);
- *Enterococcus faecalis* com 9,1% (n= 55);
- *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* com 6,5% (n=39);
- *Staphylococcus aureus* com 4,1% (n=25);
- *Streptococcus agalactiae* com 3,9% (n=18). (ver tabela de percentagens em apêndice 14)

Deste modo, é possível constatar que os microrganismos maioritariamente isolados das amostras de urina foram bacilos Gram negativo pertencentes à família das *Enterobacteriaceas*, com evidência a *E.coli*, à semelhança do que está descrito por outros autores (Muller & et al, 2008) (Kazmirczak & et al., 2005) (Jorgetto & et al, 2005) (Camargo & et al, 2001) (Orestein & et al., 1999) (Guidoni & Toporovski, 2001) (Grossman & Caroni, 2009) (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

A *Escherichia coli* é um microrganismo pertencente à flora normal do intestino humano que pode contaminar e consequentemente causar infecções extra-intestinais.

Na literatura consta que o segundo microrganismo mais isolado em urinas é *Klebsiella* spp., contudo, neste estudo *P.mirabilis* foi mais frequente (Kazmirczak & et al., 2005) (Grossman & Caroni, 2009) (Duarte & et al., 2008). A capacidade de *P.mirabilis* provocar infecções do trato urinário é facilitada pela sua capacidade em degradar a ureia.

Klebsiella pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *S.aureus* e *S.agalactiae* também surgiram com alguma frequência, à semelhança do que está descrito na literatura, onde estes microrganismos são identificados como sendo dos mais comumente isolados de amostras de urina (Kazmirczak & et al., 2005) (Jorgetto & et al, 2005) (Camargo & et al, 2001) (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007) (Calderón & et al., 2009).

Para além destas espécies foram também isolados, embora em pequenas quantidades (inferior a 15 isolamentos), os seguintes microrganismos: *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*, *Citrobacter koseri*, *Corynebacterium* sp, *Providencia stuartii*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcencens*, *Serratia liquefaciens* e *Enterobacter cloacae*.

Foi também possível a detecção de 37 leveduras, sendo na sua maioria *C.albicans*. Se compararmos o total de bactérias obtido (n=567 : ver cálculo deste valor em apêndice 15), com o total obtido para as leveduras (n=37), constatamos que o valor para estes segundos microrganismos é muito inferior. Assim sendo, conclui-se que leveduras surgem com menor frequência em amostras de urina, relativamente a bactérias (Grossman & Caroni, 2009).

O ambiente hospitalar desempenha um papel importante na selecção dos microrganismos isolados de amostras de urina, pois existem microrganismos que se desenvolvem mais facilmente em doentes hospitalizados (doentes internados) (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

Por este motivo, foi feita a distinção entre doentes internados e doentes externos, para todos os microrganismos acima mencionados. A distinção deste tipo de doentes permitiu obter os resultados representados no gráfico 3.8.

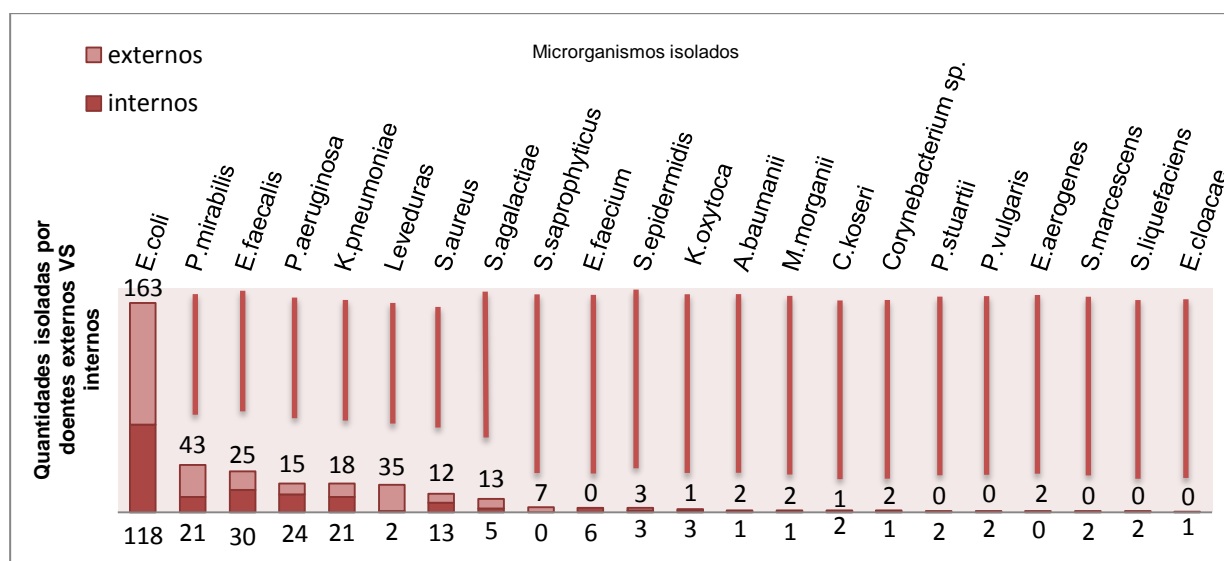


Gráfico 3. 8 Distribuição dos microrganismos isolados por doentes internados e doentes externos. (legenda: valores acima do eixo horizontal correspondem a doentes externos (rosa claro); valores abaixo do eixo horizontal correspondem a doentes internos/internados (rosa escuro)).

Observando este último gráfico, é possível verificar que os microrganismos isolados com maior regularidade neste laboratório, diferiram de doentes externos para doentes internos (internados). As espécies bacterianas com maior frequência de isolamento em doentes externos tiveram a seguinte ordem:

- *E.coli* com 47,4% (n=163)
- *P.mirabilis* com 12,5% (n=43)
- *E.faecalis* com 7,3% (n=25)
- *K.pneumoniae* com 5,2% (n=18)
- *P.aeruginosa* com 4,4% (n=15)
- *S.agalactiae* com 3,8% (n=13)
- *S.aureus* com 3,5% (n=12).

Para os doentes internos, embora se mantenha constante o tipo de microrganismos isolados mais frequentemente, a ordem foi ligeiramente diferente:

- *E.coli* com 45,4% (n=118)
- *E.faecalis* com 11,5% (n=30)
- *P.aeruginosa* com 9,2% (n=24)
- *P.mirabilis* e *K.pneumoniae* com 8,1% (n=21)
- *S.aureus* com 5,0% (n=13)

- *S.agalactiae* com 1,9% (n=5). (ver tabela com percentagens em apêndice 16)

E.coli foi a espécie mais isolada em ambos os tipos de doentes (internados e externos), sendo a maioria dos casos adquiridos em doentes externos (na comunidade). Estes resultados encontram-se de acordo a literatura (Maldaner & et al., 2011) (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

Também *P.mirabilis* foi encontrado com maior regularidade em doentes externos, relativamente a doentes internados. Este resultado pode estar relacionado com a constante associação desta espécie a cálculos urinários e doença prostática (Faria, 2010).

Quanto à espécie *E.faecalis*, foi isolada um maior número de vezes a partir de amostras provenientes de doentes internados. A sobrevivência dos microrganismos pertencentes ao género *Enterococcus* em ambiente hospitalar deve-se à sua resistência intrínseca a vários antibióticos utilizados comumente, e, talvez mais importante ainda, a sua capacidade de adquirir resistência aos antibióticos, seja por mutação ou recepção de material genético através de plasmídeos (Horner & et al, 2005).

Os resultados positivos para *P.aeruginosa* foram maioritariamente de doentes internados. A ampla resistência deste microrganismo aos antibióticos favorece a sua selecção em doentes internados (Faria, 2010).

É ainda de salientar que ao contrário do que aconteceu com *S.aureus* e *K.pneumoniae*, *S.agalactiae* foi isolado maioritariamente de doentes externos. Esta predominância em doentes externos, pode estar ligada com a sua pesquisa específica em gestantes no terceiro trimestre de gravidez, não havendo para tal a necessidade de internamento da utente. Este microrganismo tem grande relevância médica deste na contaminação de neonatos, sendo importante o despiste da portadora, para eventual profilaxia (Borger & et al., 2005).

Se observarmos a tabela que se segue, verificamos que o isolamento deste microrganismo ocorre quase exclusivamente no sexo feminino, e que grande parte da sua incidência ocorre na mulher em idade fértil (n=9).

Tabela 3. 7 Isolamentos de *S.agalactiae* por sexo e grupo etário

Grupo etário (anos)	Masculino	Feminino	Total em idade fértil =9
≤1	0	0	
2-10	0	1	
11-20	0	3	
21-30	0	3	
31-40	0	3	
41-60	0	2	
61-80	1	3	
≥ 81	1	1	
Total	2	16	

Também as leveduras foram isoladas com alguma frequência, o que corrobora a literatura (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

Para os restantes microrganismos, não foi retirada qualquer conclusão, quer em doentes externos e internos, devido à sua baixa incidência (n≤15).

Também a distinção entre doentes algaliados e não algaliados é importante para a avaliação dos microrganismos isolados na urina, pois a presença de cateter temporário ou permanente pode influenciar na selecção dos microrganismos.

Dos 500 produtos com resultado positivo, foi possível o isolamento de um total de 604 microrganismos. Esta diferença de valores entre produtos e microrganismos, está relacionada com a detecção de 71 amostras polimicrobianas (14,2%), nomeadamente em indivíduos algaliados.

Tabela 3. 8 Amostras polimicrobianas (2 e 3 tipos diferentes de microrganismos na mesma amostra) em doentes algaliados e não algaliados.

	Doentes algaliados		Doentes não algaliados		
tipos microrganismos	n	%	n	%	total amostras
1	93	59	319	93	412
2	48	31	24	7	72
3	16	10	0	0	16
total amostras	157		343		500
total microrganismos	237		367		604

A introdução de cateter no aparelho urinário, especialmente os que permanecem durante algum tempo, acarreta um risco de infecção urinária. A cateterização e a sua longa permanência são factores que favorecem a colonização e facilitam o aparecimento de infecções urinárias, que em alguns casos pode ser assintomática (Sahm, Forbes, & Weissfeld, 2007).

Por este motivo, a detecção de floras polimicrobianas é mais frequente em doentes algaliados (41%: ver cálculo deste valor em apêndice 17), do que em indivíduos não algaliados (7%).

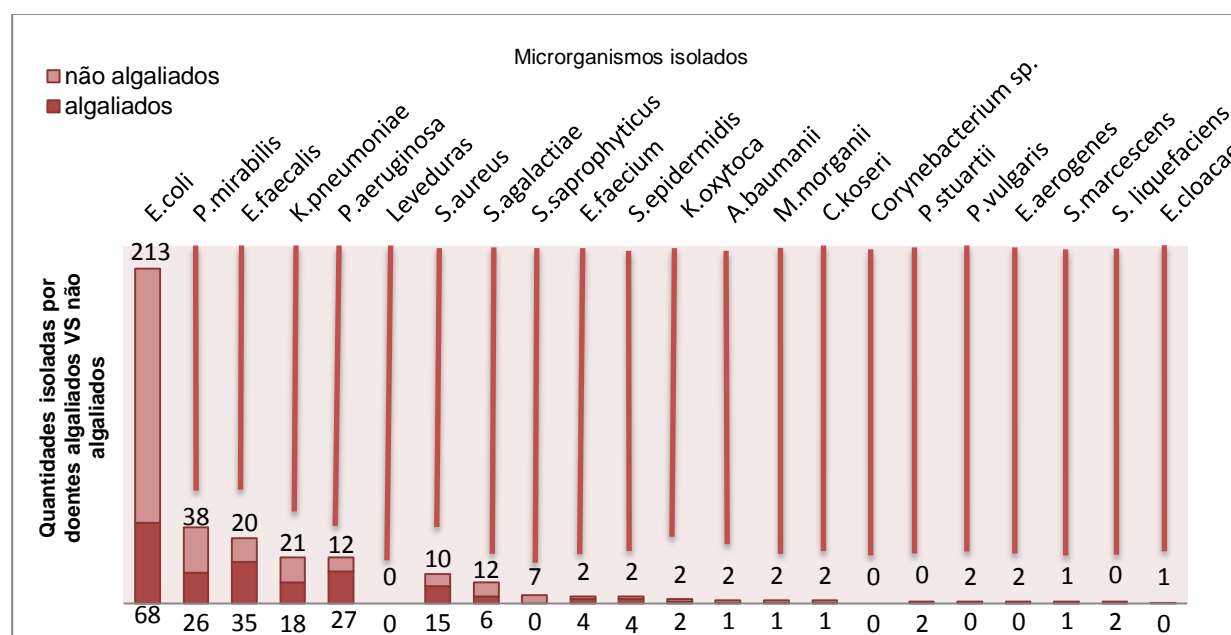


Gráfico 3. 9 Distribuição dos microrganismos por doentes algaliados e não algaliados

Lengenda do Gráfico: valores acima do eixo horizontal correspondem a doentes não algaliados (rosa claro); e valores abaixo do eixo horizontal correspondem a doentes algaliados (rosa escuro).

Pode-se constatar, através do gráfico 3.9, que para os indivíduos não algaliados houve um maior isolamento com a seguinte ordem:

- *E.coli* com 60,7% (n=213)
- *P.mirabilis* com 10,8% (n=38)
- *Klebsiella pneumoniae* 6,0% (n=21)
- *E.faecalis* com 5,7% (n=20)
- *P.aeruginosa* e *S.agalactiae* com 3,4% (n=12)
- *S.aureus* com 2,8%(n=10).

Para os indivíduos algaliados, a ordem alterou-se ligeiramente para:

- *E.coli* com 31,9% (n=68)
- *E.faecalis* com 16,4% (n=35)
- *P.aeruginosa* com 12,7% (n=27)
- *P.mirabilis* com 12,2% (n=26)
- *K.pneumoniae* com 8,5% (n=18)
- *S.aureus* com 7,0% (n=15)
- *S.agalactiae* com 2,8% (n=6). (ver tabela com percentagens em apêndice 18)

Mais uma vez, à semelhança do que aconteceu quando foi feita a distinção entre doentes internos e externos, a espécie *E.coli* foi o microrganismo isolado com maior afluência quer em doentes algaliados, quer não algaliados. No entanto, pôde constatar-se que esta espécie foi mais frequente em indivíduos não algaliados. Os microrganismos encontrados apresentaram percentagens de isolamento que diferem significativamente das obtidas para doentes internados/externos. O que corrobora a teoria de que estes dois determinantes estão relacionados com a selecção dos microrganismos.

Também foi possível verificar que houve maior número de isolamentos em indivíduos algaliados, relativamente a indivíduos não algaliados, para os seguintes microrganismos: *E.faecalis*, *S.aureus*, e *P.aeruginosa*.

Alguns destes resultados podem estar relacionados com a capacidade dos microrganismos em aderir a superfícies plásticas de corpos estranhos, como cateteres (Forbes & Sahm, 2004) (Washington Jr. et al, 2006) (Muller & et al, 2008) .

S.agalactiae foi, tal como esperado, mais isolado em doentes não algaliados, pois como já foi referido anteriormente, esta espécie é pesquisada especificamente em gestantes.

Mais uma vez, não foi feita qualquer observação para os restantes microrganismos, devido aos baixos valores que apresentaram.

Nos gráficos e tabelas que se seguem avaliou-se a incidência dos microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo e grupo etário.

Tabela 3. 9 Percentagens de microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo feminino e grupo etário

etário	
Grupo etário	Percentagens
≤1	0
2-10	0
11-20	0
21-30	0
31-40	3,0
41-60	5,1
61-80	23,2
≥ 81	27,4
Total	58,6

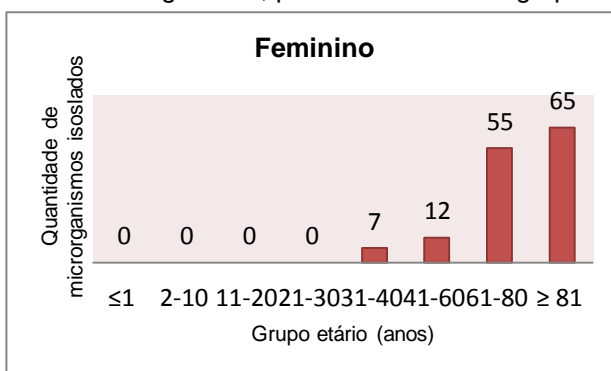


Gráfico 3. 10 Microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo feminino e grupo etário

Os valores apresentados anteriormente (gráfico 3.10 e tabela 3.9), para o sexo feminino, demonstram que a incidência de uroculturas positivas em indivíduos algaliados foi de 58,6% (n = 139 : ver cálculo deste valor em apêndice 19).

Só se obtiveram isolamentos acima dos 31 anos, e foi notável um aumento da sua incidência com a idade.

Idades superiores a 60 anos foram as que apresentaram uma percentagem de uroculturas positivas mais significativa, com 50,6% (n=120 : ver cálculo destes valores em apêndice 19), do total de microrganismos isolados em ambos os sexos. Isto é, mais de metade dos microrganismos isolados resultaram de indivíduos do sexo feminino, nomeadamente em idades superiores a 60 anos.

Tabela 3. 10 Percentagens microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo masculino e grupo etário

Grupo etário	Percentagens
≤1	0,4
2-10	0,0
11-20	0,0
21-30	0,0
31-40	0,0
41-60	4,6
61-80	21,5
≥ 81	14,8
Total	41,4

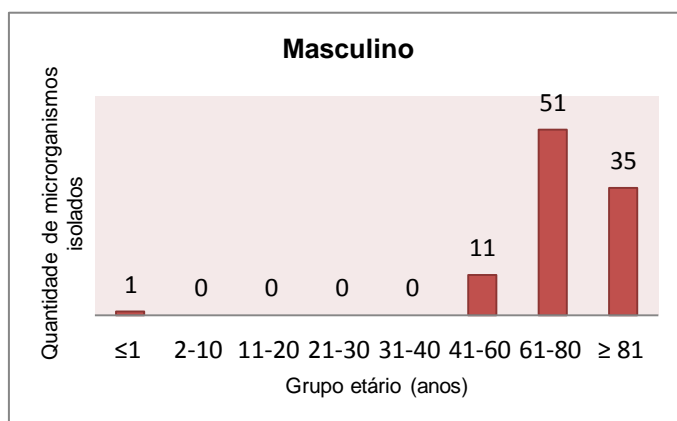


Gráfico 3. 11 Microrganismos em indivíduos algaliados, por sexo masculino e grupo etário

Para o sexo masculino (gráfico 3.11 e tabela 3.10), observou-se que a incidência de uroculturas positivas foi de 41,4% (n=98 : ver cálculo deste valor em apêndice 20).

Só foram isolados microrganismos em indivíduos com idade superior a 40 anos, com excepção de um único isolamento numa criança com menos de 1 ano.

Também para este sexo se registou uma percentagem de uroculturas positivas mais significativa acima dos 60 anos, com 36,3% (n=86 : ver cálculo destes valores em apêndice 20), do total de microrganismos isolados em ambos os sexos.

Ao contrário do que aconteceu para o sexo feminino, nota-se que para idades acima de 81 anos, existiu um ligeiro decréscimo da incidência de uroculturas positivas, isto é, não ocorreu um aumento sucessivo. Este resultado pode estar relacionado com a esperança média de vida associada a ambos os sexos:

- 76,14 anos para os homens;
- 82,05 anos para as mulheres (INE, 2010).

Como a esperança média de vida para os homens se situa abaixo dos 80 anos, é normal que a percentagem de isolamentos de microrganismos em uroculturas diminua do grupo etário dos 61-80 anos para o grupo etário acima 81 anos .

Posto isto, podemos constatar que a frequência de uroculturas positivas em indivíduos algaliados foi maior em :

- indivíduos do sexo feminino (58,6%);
- em idades superiores a 61 anos, com 86,9% (n=206 :ver cálculo destes valores em apêndice 20).

A incidência de uroculturas positivas em idades mais avançadas pode estar relacionada com o facto destes indivíduos estarem mais susceptíveis a adquirir infecção hospitalar devido à diminuição da resposta imunológica, o que causa vulnerabilidade a condições adversas, tal como estes procedimentos invasivos.

Estes resultados corroboram os obtidos para o estudo feito inicialmente para o total de microrganismos isolados, onde as uroculturas positivas também foram mais frequentes em indivíduos do sexo feminino, e em idades superiores a 60 anos.

4. Conclusões:

Com o primeiro estudo (trabalho1) foi possível concluir que a urina é o produto biológico mais analisado neste laboratório, independentemente do semestre. Sendo a infecção urinária uma das mais frequentes.

Com o segundo estudo (trabalho 2), analisaram-se 1408 amostras de urina, tendo-se verificado que a grande maioria eram negativas (64%). Notou-se um predomínio de uroculturas positivas no sexo feminino (68%), verificando-se isolamentos de microrganismos em todos os grupos etários, contrariamente ao que se verificou para o sexo masculino, onde entre os 11 e os 30 anos não se obtiveram uroculturas positivas.

Verificou-se também um predomínio destas uroculturas positivas em idades superiores a 60 anos (63,2%) para ambos os sexos.

Destas uroculturas positivas foi possível isolar 22 tipos de microrganismos. Os microrganismos com percentagens de isolamento baixas ($n < 15$), não foram incluídos no estudo.

E.coli foi o microrganismos mais isolado neste estudo, com 46,5%, seguido de outros bacilos Gram negativo, nomeadamente *Enterobacteriaceas* spp., e alguns cocos Gram positivo.

Os microrganismos mais frequentemente isolados variaram a sua ordem de acordo com a situação clínica em estudo (doentes internados/externos e doentes algaliados/não algaliados).

Para os indivíduos algaliados, foi ainda possível constatar que apresentaram com maior frequência amostras polimicrobianas.

Com este estudo foi possível tomar conhecimento da prevalência dos patogénicos locais, mediante diversos determinantes. Este conhecimento é de extrema importância a nível clínico, pois juntamente com o conhecimento do perfil de susceptibilidade, vai permitir a elaboração de protocolos de actuação terapêutica importantes para um tratamento mais rápido e adequado.

Esta página foi propositadamente deixada em branco

5. Bibliografia

- Arcuri, E. F., et al. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, 38(8).
- Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*, 4ªed. University of texas Medical Branch at Galveston. Texas
- Becton, D. a. (2003). *MacConkey Agar with Sorbitol*. Obtido em 12 de janeiro de 2012, de <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PA-254455.pdf> instructions for use:ready-to-use plated media, www.bd.com
- Becton, D. a. (2011). *Granada Medium*. Obtido em 2012 de janeiro de 2012, de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9016> instructions for use:ready-to-use plated media www.bd.com
- Becton, D. a. (2011). *Hektoen Enteric Agar*. Obtido em 10 de fevereiro de 2012, de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8970> instructions for use:ready-to-use plated media, <http://www.bd.com>
- BioMérieux. (2002). *Gelose Mueller Hinton 2*. BioMérieux S.A. France
- BioMérieux. (2003). *Caldo Todd Hewitt + Antibióticos*. BioMérieux S.A. France
- BioMérieux. (2004). *Bact/Alert MB*. BioMérieux S.A. France
- BioMérieux . (2004). *Gelose Legionella GVPC: Isolamento selectivo das legionellas*. France: BioMérieux S.A.
- BioMérieux. (2005). *VITEK 2 Compact* . Obtido em 2012 de junho de 15, de http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_NWS_RLS&doc=PTG_NWS_RLS_G_PRS_RLS_42&crptprm=ZmlsdGVyPQ== Notícias, www.biomerieux.pt
- BioMérieux. (2005). *Oxidase Reagent*. BioMérieux S.A. France
- BioMérieux. (2006). *Gelose MRSA*. BioMérieux S.A. France
- BioMérieux. (2009). *Your Partner for culture media*. BioMérieux S.A. France
- BioMérieux. (2012). *Etest*. Obtido em 2012 de junho de 2, de http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_CLN_PRD_G_PRD_CLN_22 Products, <http://www.biomerieux-diagnostics.com>
- BioMérieux. (2012). *Produtos conventional culture media*. Obtido em 10 de setembro de 2012, de [www.biomerieux-diagnostics.com](http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_22&pubparams.sform=6&lang=en): http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?open=CNL_CLN_PRD&doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_22&pubparams.sform=6&lang=en

- Borger, I., et al. (2005). *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos. *Rev.Bras.Ginecol.Obstet.*, 27(10).
- Calderón, U., et al. (2009). Pielonefritis aguda en el embarazo y susceptibilidad antimicrobiana de uropatógenos: Comparación de dos décadas. *Rev. Chil. Obstetricia e Ginecologia*, 74(2): 88-93.
- Camargo, I., et al. (2001). Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário - uma revisão técnica. *Revista Medicina*, 34: 70-78.
- CLSI. (2011). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*. CLSI. USA
- de la Maza, L., Pezzlo, M., & Baron, H. (1999). *Atlas de Diagnóstico em Microbiologia*. Artmed. Porto alegre
- Duarte, G., et al. (2008). Infecção urinária na Gravidez. *Rev.Brasileira Ginecol. Obstet.*, 30(2): 93-100.
- Faria, S. (2010). *Relatório de Estágio: Análises Clínicas. Tese de Mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia*.
- Fonseca et al., A. (2004). *Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia*. PNCI, Ministério da Saúde: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- Forbes, B., & Sahm, D. (2004). *Diagnóstico Microbiológico*. Médica Panamericana. Buenos Aires
- Freitas, V., & Picoli, S. (2007). A coloração de Gram e as variações na sua execução. *NewsLab*, 82.
- Grossman, E., & Caroni, M. (2009). Infecção urinária na adolescência. *Adolescência e Saúde*, 6(4).
- Guidoni, E., & Toporovski, J. (2001). Infecção urinária na adolescência. *Jornal de Pediatria*, 77(2).
- Horner, R., et al. (2005). Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *J.Bras.Patol. Med.Lab.*, 41(6):391-5.
- INE. (2010). *Indicadores Sociais*. Instituto Nacional de Estatísticas. Lisboa
- Jorgetto, G., et al. (2005). Ocorrência de Infecção urinária em pacientes psiquiátricos de uma instituição de longa permanência. *Revista electrónica de Enfermagem*, 7(2).
- Kazmirczak, A. et al. (2005). Caracterização das infecções do trato urinário no Município de Guarani das Missões - RS. *RBAC*, 37(4): 205-207.
- Linhares, I., et al. (2010). Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. *Revista Associação de Medicina Brasileira*, 56(3): 370-4.
- Macfaddin, J. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacterial*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
- Madigan, M., et al. (2012). *Biology of Microorganisms*. Pearson. São Francisco

- Maldaner, N., et al. (2011). Perfil Antimicrobiano de Cepas de Escherichia coli Isolados de Pessoas com Suspeita de Infecção do Trato Urinário. *RBAC*, 43(2): 145-147.
- Melo, M. et al. (2007). Bactérias Isoladas de Ponta de Cateter Venoso Central e Suscetibilidade Antimicrobiana em um Hospital Público de Belém-PA. *RBAC*, 39(2): 115-118.
- Mena, C., et al. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21: 213–216.
- Menin, V., et al. (2010). Infecções do trato urinário Diagnosticadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS. *RBAC*, 42(4): 307-310.
- Muller, E., et al. (2008). Prevalência de microrganismos em infecções do trato urinário de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas da Universidade Paranaense-Umuarama-PR. *RBAC*, 40(1): 35-37.
- Murray, P. R. (2007). *Microbiología médica*, 7ªed. Elsevier S.A. Madrid
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2002). *Lehninger Princípios de Bioquímica*. CLR Balieiro editores. São Paulo
- Oliveira, A., et al. (2005). Isolamento de *Corynebacterium aquaticum* em leite bubalino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 42(4).
- Orestein, D., et al. (1999). Urinary tract infections in adults. *Am.Fam.Physician*, 59(5): 1225-1234.
- Pereira, M., & Palomo, F. (2010). Análise de sistema automatizado para coloração de Gram desenvolvido pela Hemogram. *Universidade Federal de São Paulo: NewsLab*, 102.
- Pereira, R., & Petrechen, G. G. (2011). *Principais Métodos Diagnósticos Bacterianos - revisão de literatura*. São Paulo, Brasil: Revista Científica Electrónica de Medicina Veterinária.
- Pinto A.M., (2004). Flora microbiana, Sistema Imunitário e Atopia. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, XII: 199-208.
- Poeta, P., & Rodrigues, J. (2008-2009). *Identificação de Bactérias com interesse em Microbiologia Médica- parte I,II,III e IV*. UTAD. Vila Real
- Sahm, D., Forbes, B., & Weissfeld, A. (2007). *Diagnostic Microbiology 12ªed*. Elsevier. China
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Universidade Fernando Pessoa. Porto
- Souza, M. P. (2011). *Staphylococcus aureus* Resistente à Oxacilina. *NewsLab*, 105.
- Stansfield, W. C. (2005). *Biologia Molecular e Celular, Teoria e Exercícios*. McGraw-Hill. Lisboa
- Trindade, R. B. (1999). Conjuntival Microbial Flora of Clinically Normal Persons who work in a Hospital environment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:12-16.
- Vandenplas, Y. (2009). Gastrointestinal Flora Composition and Health. *Journal de Pediatria*, 85(4):285-286.

Versalovic, J. et al. (2011). *Manual of clinical microbiology volume I*. ASM: Press. Canadá

Vieira, M. (2009). Ilhas de patogenicidade. *O Mundo da Saúde*, 33(4): 406-414.

Washington C. Jr., et al, (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic*. Lippincott William & Wilkins. Philadelphia

6. Apêndices:

❖ Apêndice 1

Tabela 6. 1 Resistências intrínsecas de Microrganismos Gram negativo (R=Resistente)

Microrganismo	Ampicilina	Amoxacilina + Ác. Clavulânico	Ticarcilina	Piperacilina	Cefoxitina	Cefuraxima	Trimetoprim + sulfametoxazol	Nitrofurantóina
<i>Klebsiella spp.</i>	R	--	R	--	--	--	--	--
<i>E.coli</i>	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>P.mirabilis</i>	--	--	--	--	--	--	R	R
<i>P.vulgaris</i>	R	--	--	--	--	--	R	R
<i>Pseudomonas spp.</i>	--	--	--	--	--	--	R	--

Tabela 6. 2 Resistências intrínsecas de Microrganismos Gram positivo (R=Resistente)

Microrganismo	Polimixina B	Eritromicina	Clindamicina	Novobiocina	Ampicilina
<i>S.saprophyticus</i>	--	--	--	R	--
<i>S.aureus</i>	R	--	--	--	--
<i>S.coagulase negativo</i>	--	--	--	--	--
<i>Streptococcus sp.</i>	--	--	--	--	--
<i>E.faecalis</i>	--	R	R	--	--
<i>E.faecium</i>	--	R	--	--	R

❖ Apêndice 2

Tabela 6. 3 Antibióticos utilizados no método de Kirby-Bauer

Gram negativos	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	Outros Gram negativo
Cefuraxima	Estreptomicina altamente concentrada	Cefoxitina	Colistina
Cefoxitina	Ampicilina	Ciprofloxacina	Amicacina
Cefalotina	Linezolid	Cloranfenicol	Tobramicina
Ampicilina	Ciprofloxacina	Penicilina	Gentamicina
Ticarcilina	Gentamicina altamente concentrada	Oxacilina	Ceftazidima
Tobramicina	Vancomicina	Teicoplanina	Trimetoprim + Sulfametoxazol
Gentamicina	Nitrofurantoína	Eritromicina	Piperacilina + Tazobactam
Amicacina	Teicoplanina	Tetraciclina	Aztreonamo
Meropenem	Novobiocina	Vancomicina	Ticarcilina
Cefotaxima		Gentamicina	Piperacilina
Amoxicilina+ Ác.clavulânico		Clindamicina	Cefpime
Nitrofurantoína		Nitrofurantoína	Meropenemo
Piperacilina + Tazobactam		Trimetoprim+ Sulfametoxazol	Imipenemo
Trimetoprim + Sulfametoxazol : Cotrimoxazole		Polimixina B	Ciprofloxacina
Ceftazidima		Linezolid	
Ciprofloxacina		Novobiocina	

❖ Apêndice 3

Morfologia típica de algumas *Enterobactereaceas*

Colônias de *E.coli* em gelose de sangue apresentam tipicamente uma coloração creme, podendo algumas estirpes apresentar hemólise . Em MacConkey normalmente são fermentadoras de lactose (Lac+), de cor rosa, brilhantes e com depressão central.

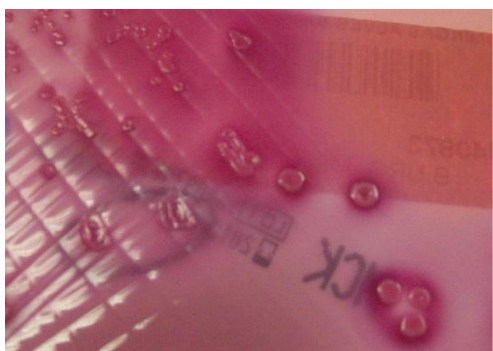


Figura 6. 1 Colônias de *E.coli* em MacConkey (foto deste trabalho).

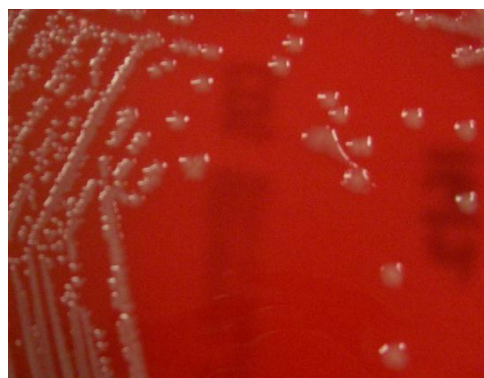


Figura 6. 2 Colônias de *E.coli* em gelose sangue (foto deste trabalho).

Klebsiella sp. em MacConkey apresenta regularmente colônias grandes, fermentadoras de lactose (Lac+), de cor de rosa, brilhantes e mucóides.



Figura 6. 3 Colônias de *Klebsiella pneumoniae* em MacConkey (foto deste trabalho).

Proteus spp. em gelose Sangue apresenta na grande maioria das vezes um “véu” resultante da sua mobilidade. Em MacConkey estas colônias são tipicamente transparentes, isto é, não fermentadoras de lactose (Lac-)



Figura 6. 4 Colônias de *Proteus mirabilis* em gelose Sangue (foto deste trabalho).



Figura 6. 5 Colônias de *Proteus mirabilis* em MacConkey (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 4

Morfologia típica de *P.aeruginosa*

Em gelose Sangue as colônias normalmente apresentam um bordo irregular e uma pigmentação que as distingue das outras *Pseudomonas* spp.: azul-esverdeado (pigmento piocianina) ou vermelho acastanhado (pigmento piorubina). Frequentemente apresentam um brilho metálico e é β -hemolítica. (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)

Em agar de MacConkey as colônias são tipicamente não fermentadoras de lactose (Lac-), podendo apresentar pigmentação esverdeada, ou acastanhada. (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)

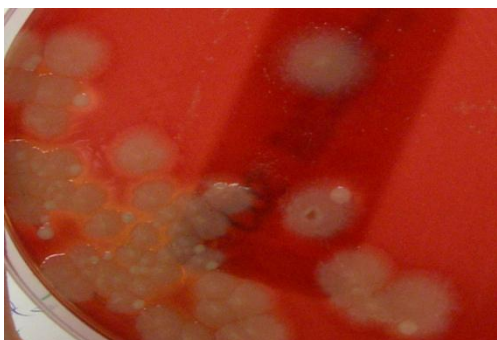


Figura 6. 6 Colônias de *P.aeruginosa* em gelose sangue (foto deste trabalho).

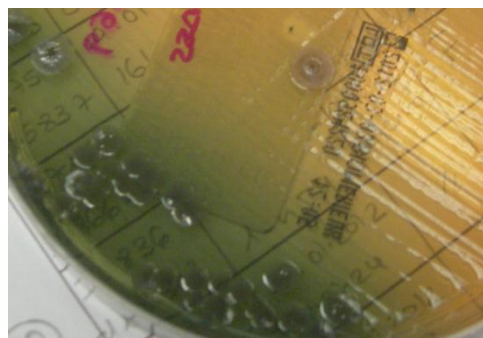


Figura 6. 7 Colônias de *P.aeruginosa* em MacConkey (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 5

Morfologia típica de estafilococos.

As colônias de *Staphylococcus* coagulase negativa, em gelose sangue, são normalmente de cor branca e sem hemólise, já as colônias de *S.aureus* apresentam normalmente uma coloração creme/camurça, circundadas por uma zona de β -hemólise. (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)

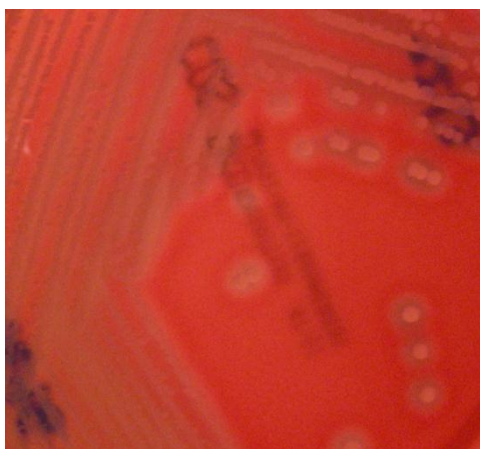


Figura 6. 8 Colônias de *S.aureus* em gelose sangue (foto deste trabalho).

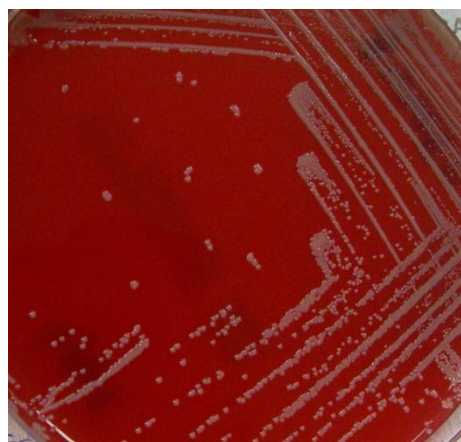


Figura 6. 9 Colônias de Estafilococos coagulase negativa em gelose sangue (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 6

Morfologia típica em *Enterococcus* spp.

As colônias, em gelose sangue, apresentam tipicamente cor branca ou acizentada, geralmente sem hemólise. (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)



Figura 6. 10 Colônias de *Enterococcus* spp. em gelose sangue (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 7

Morfologia típica de *Streptococcus* spp.

S.agalactiae em gelose Sangue apresenta normalmente colônias grandes, mas com uma β -hemólise pequena. (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)

S.pneumoniae em gelose Sangue apresenta regularmente colônias translúcidas, mucóides ou não, e circundadas por α -hemólise. (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)



Figura 6. 11 Colônias de *S.agalactiae* em gelose sangue (foto deste trabalho).

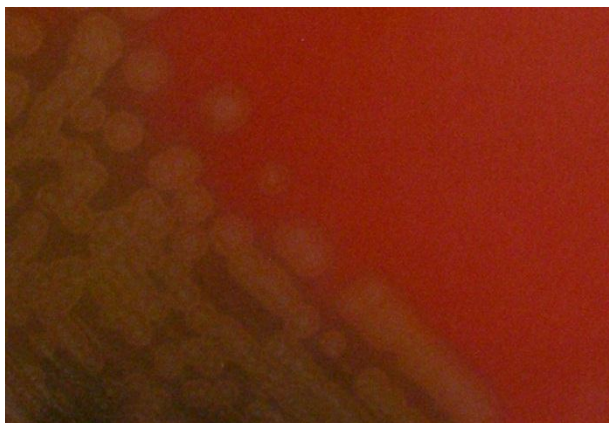


Figura 6. 12 Colônias de *S.pneumoniae* em gelose sangue (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 8

Observação microscópica de *Corynebacterium* spp.

Alguns *Corynebacterium* spp. (frequentemente chamados de difteróides) apresentam-se como colônias pequenas, branco-acizentadas e não hemolíticas, em gelose sangue. Podem facilmente ser confundidas com colônias de estreptococos, especialmente quando isoladas do aparelho respiratório.

Algumas espécies aparecem brancas e opacas, semelhantes a estafilococos coagulase-negativos. (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)

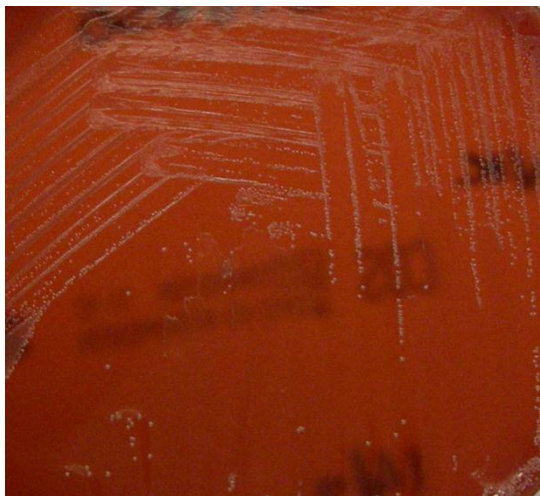


Figura 6. 13 Colônias de *Corynebacterium* spp. em gelose sangue (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 9

Leveduras

Ao microscópio apresentam coloração azul (Gram positivo) e são fáceis de identificar devido às suas dimensões celulares.

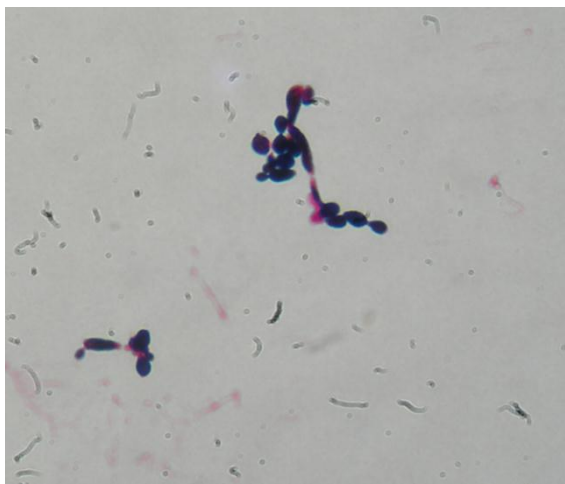


Figura 6. 14 Leveduras ao microscópico (1000X) (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 10

Morfologia típica de *Haemophilus influenzae*

As colônias de *H.influenzae* são lisas, redondas, planas, algumas vezes opacas e acizentadas. *H.influenzae* requer ambos os factores X e V para o seu crescimento (ambos estão presentes em gelose chocolate). (de la Maza, Pezzlo, & Baron, 1999)

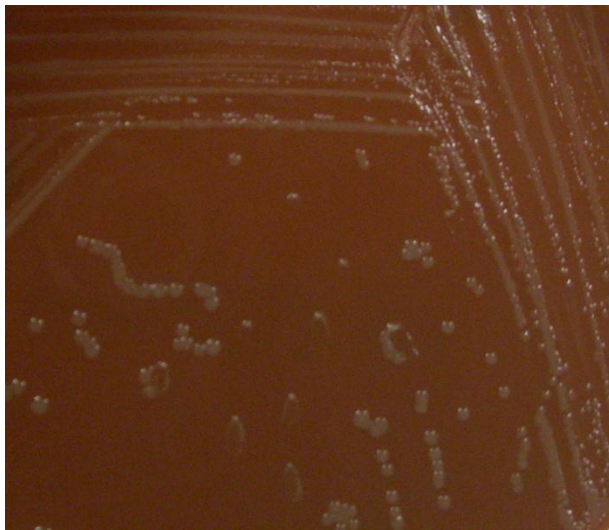


Figura 6. 16 *H.influenzae* em gelose chocolate (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 11

Parasitologia



Figura 6. 17 Ovo de *Ascaris lumbricoides* (400x) (foto deste trabalho).

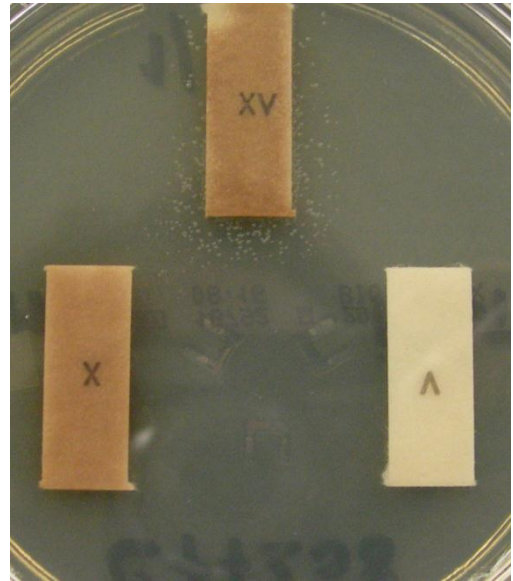


Figura 6. 15 Demonstração da exigência dos factores de crescimento para *H.influenzae* (foto deste trabalho).



Figura 6. 18 Ovo de *Trichuris trichiura* (400x) (foto deste trabalho).



Figura 6. 19 quisto de *Entamoeba* spp. (400x) (foto deste trabalho).



Figura 6. 20 Larva de *Strongyloides* spp. (400x) (foto deste trabalho).



Figura 6. 21 Ovo de *Ancylostoma* spp. (400x) (foto deste trabalho).

❖ Apêndice 12

Resultados normalmente obtidos com testes de identificação presuntiva

Tabela 6. 4 Resultados de testes de identificação que normalmente se verificam em bacilos Gram negativo (resultado para 90% das estirpes, ou mais)

Microrganismo	Oxidase	Urease	Indol	Indol
<i>E.coli</i>	Negativo	Negativa	Positivo	
<i>Klebsiella</i> sp.	Negativo	Positiva	negativo: <i>K.pneumoniae</i>	Positivo: <i>K.oxytoca</i>
<i>Proteus</i> sp.	Negativo	Positiva	Negativo: <i>P.mirabilis</i>	Positivo: <i>P.vulgaris</i>
<i>P.aeruginosa</i>	Positivo			

Tabela 6. 5 Resultados de testes de identificação que normalmente se verificam em Estafilococos
(Cocos Gram positivo)

Microrganismo	catalase	Coagulase
<i>S.aureus</i>	Positiva	Positiva
Estafilococos coagulase negativo	Positiva	Negativa

Tabela 6. 6 Resultados de testes de identificação que normalmente se verificam em Estreptococos
(Cocos Gram positivo)

Microrganismo	catalase	Hidrólise de esculina	CAMP Test
<i>S.pneumoniae</i>	Negativa	Negativa	Negativa
<i>S.agalactiae</i>	Negativa	Negativa	Positivo

Tabela 6. 7 Resultados de testes de identificação que normalmente se verificam em Enterococos
(Cocos Gram positivo)

Microrganismo	catalase	Hidrólise de esculina
<i>Enterococcus</i> spp.	Negativa	Positiva

❖ Apêndice 13

Cálculo da percentagem de uroculturas acima dos 60 anos

Resultado: $14,2+11,4+21,0+16,6=63,2\%$

❖ Apêndice 14

Tabela 6. 8 Resultados para os microrganismos obtidos nas uroculturas positivas

microrganismos	Total	Percentagens
<i>P.mirabilis</i>	64	10,6
<i>K.pneumoniae</i>	39	6,5
<i>K.oxytoca</i>	4	0,7
<i>A.baumannii</i>	3	0,5
<i>E.faecalis</i>	55	9,1
<i>E.faecium</i>	6	1,0
<i>S.epidermidis</i>	6	1,0
<i>S.saprophyticus</i>	7	1,2
<i>S.aureus</i>	25	4,1
<i>S.agalactiae</i>	18	3,0
<i>P.aeruginosa</i>	39	6,5
<i>P.stuartii</i>	2	0,3
<i>M.morganii</i>	3	0,5
<i>E.coli</i>	281	46,5
<i>P.vulgaris</i>	2	0,3
<i>E.aerogenes</i>	2	0,3
Leveduras	37	6,1
<i>C.koseri</i>	3	0,5
<i>S.marcescens</i>	2	0,3
<i>E.cloacae</i>	1	0,2
<i>S.liquefaciens</i>	2	0,3
<i>Corynebacterium sp.</i>	3	0,5
total	604	100

❖ Apêndice 15

Cálculo do total de bactérias:

<p>Total de microrganismos= 604</p> <p>Total de leveduras =37</p> <p>Total de bactérias=604-37= 567 bactérias</p>
--

❖ Apêndice 16

Tabela 6. 9 Uroculturas positivas para doentes internos e doentes externos

Microrganismos	n (internos)	% (internos)	n (externos)	% (externos)
<i>P.mirabilis</i>	21	8,1	43	12,5
<i>K.pneumoniae</i>	21	8,1	18	5,2
<i>K.oxytoca</i>	3	1,2	1	0,3
<i>A.baumannii</i>	1	0,4	2	0,6
<i>E.faecalis</i>	30	11,5	25	7,3
<i>E.faecium</i>	6	2,3	0	0,0
<i>S.epidermidis</i>	3	1,2	3	0,9
<i>S.saprophyticus</i>	0	0,0	7	2,0
<i>S.aureus</i>	13	5,0	12	3,5
<i>S.agalactiae</i>	5	1,9	13	3,8
<i>P.aeruginosa</i>	24	9,2	15	4,4
<i>P.stuartii</i>	2	0,8	0	0,0
<i>M.morganii</i>	1	0,4	2	0,6
<i>E.coli</i>	118	45,4	163	47,4
<i>P.vulgaris</i>	2	0,8	0	0,0
<i>E.aerogenes</i>	0	0,0	2	0,6
Leveduras	2	0,8	35	10,2
<i>C.koseri</i>	2	0,8	1	0,3
<i>S.marcescens</i>	2	0,8	0	0,0
<i>E.cloacae</i>	1	0,4	0	0,0
<i>S.liquefaciens</i>	2	0,8	0	0,0
<i>Corynebacterium spp.</i>	1	0,4	2	0,6
total	260	100	344	100

❖ Apêndice 17

Cálculo de amostras polimicrobianas em doentes algaliados

Resultado= 31+10= 41%

❖ Apêndice 18

Tabela 6. 10 Uroculturas positivas para doentes algaliados e não algaliados

Microrganismos	(n)Algaliados	(%)Algaliados	(n) não Algaliados	(%) não algaliados	(n) Total	(%) total
<i>P.mirabilis</i>	26	12,2	38	10,8	64	11,3
<i>K.pneumoniae</i>	18	8,5	21	6,0	39	6,9
<i>K.oxytoca</i>	2	0,9	2	0,6	4	0,7
<i>A.baumannii</i>	1	0,5	2	0,6	3	0,5
<i>E.faecalis</i>	35	16,4	20	5,7	55	9,8
<i>E.faecium</i>	4	1,9	2	0,6	6	1,1
<i>S.epidermidis</i>	4	1,9	2	0,6	6	1,1
<i>S.saprophyticus</i>	0	0,0	7	2,0	7	1,2
<i>S.aureus</i>	15	7,0	10	2,8	25	4,4
<i>S.agalactiae</i>	6	2,8	12	3,4	18	3,2
<i>P.aeruginosa</i>	27	12,7	12	3,4	39	6,9
<i>P.stuartii</i>	2	0,9	0	0,0	2	0,4
<i>M.morganii</i>	1	0,5	2	0,6	3	0,5
<i>E.coli</i>	68	31,9	213	60,7	281	49,8
<i>P.vulgaris</i>	0	0,0	2	0,6	2	0,4
<i>E.aerogenes</i>	0	0,0	2	0,6	2	0,4
Leveduras	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C.koseri</i>	1	0,5	2	0,6	3	0,5
<i>S.marcescens</i>	1	0,5	1	0,3	2	0,4
<i>E.cloacae</i>	0	0,0	1	0,3	1	0,2
<i>S.liquefaciens</i>	2	0,9	0	0,0	2	0,4
<i>Corynebacterium sp.</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0
total	213	100	351	100	564	100

❖ Apêndice 19

Cálculos para doentes algaliados do sexo feminino:

Número total de uroculturas positivas de indivíduos algaliados, no sexo feminino:

$$\text{Resultado} = 7 + 12 + 55 + 65 = 139$$

Número total para indivíduos com idade superior a 60 anos:

$$\text{Resultado} = 65 + 55 = 120$$

Percentagem de indivíduos com idades superiores a 60 anos:

$$\text{Resultado} = 23,2 + 27,4 = 50,6\%$$

❖ Apêndice 20

Cálculos para doentes algaliados do sexo feminino:

Número total de utoculturas positivas de indivíduos algaliados, no sexo masculino:

$$\text{Resultado} = 11 + 51 + 35 + 1 = 98$$

Número total para indivíduos com idade superior a 60 anos:

$$\text{Resultado} = 51 + 35 = 86$$

Percentagem de indivíduos com idades superiores a 60 anos:

$$\text{Resultado} = 21,5 + 14,8 = 36,3\%$$

Total de isolamentos acima dos 61 anos, para ambos os sexo:

$$\text{Resultados} = 120 + 86 = 206$$

$$\text{Resultado em percentagem} = 50,6 + 36,3 = 86,9\%$$